

ANA PAULA RAMOS DE OLIVEIRA

**Desenvolvimento de membranas de
gelatina/quitosana e o estudo do processo de
reticulação**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos - da Universidade de São Paulo, USP.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo

São Carlos,
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

O48d Oliveira, Ana Paula Ramos de
Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana
e o estudo do processo de reticulação / Ana Paula Ramos
de Oliveira; orientadora Eliana Cristina da Silva
Rigo. São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2013.

1. quitosana. 2. gelatina. 3. gluraldeído. 4.
membranas. 5. intumescimento. 6. RTG. I. Título.



Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Ana Paula Ramos de Oliveira

Título: "Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o estudo do processo de reticulação".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA -
EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 4 / 10 / 2013

Profª. Drª. Eliana Cristina Da Silva Rigo
(Orientadora)

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos - USP

RESULTADO: aprovada

ASSINATURA: EC Rigo

Profª. Drª. Juliana Marchi

Universidade Federal do ABC - UFABC

RESULTADO: aprovada

ASSINATURA: J Marchi

Profª. Drª. Neide Aparecida Mariano

Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

RESULTADO: aprovada

ASSINATURA: Neide Mariano

Homologado em: 1 / 1

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo pela orientação e ensinamentos, os quais foram muito importantes para meu desenvolvimento e amadurecimento profissional e intelectual.

À Dra. Luci Cristina de Oliveira Vercik, ao Dr. Marinônio Lopes Cornélio e a Ms. Cintia Ramos Camargo pelos ensinamentos e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os amigos do laboratório do nosso grupo de pesquisa de materiais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP - do departamento de Ciências Básicas que fizeram parte da minha vida acadêmica.

À minha família por todo apoio e esforços para que eu realizasse e concluísse essa etapa de meus estudos

RESUMO

OLIVEIRA, Ana Paula Ramos de. **Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o estudo do processo de reticulação**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/ FMRP/ IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A formação do biofilme nas áreas subgengivais pode levar a respostas vasculares e celulares, as quais podem resultar na doença periodontal, portanto, periodontite crônica são a inflamação crônica e progressiva, caracterizada clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem, perda de inserção gengival e osso alveolar. Em estudos de lesões que ocorrem no processo alveolar, é observado que estas muitas vezes cicatrizam com o tecido fibroso, em vez do tecido ósseo. A regeneração tecidual guiada (RTG) é um dos tratamentos para reconstituição de novo tecido, o qual utiliza membranas como barreira de proteção física da área defeituosa. Esta barreira previne a invasão de outros tecidos e permite repovoamento seletivo da superfície da raiz pelas células do ligamento periodontal e osso alveolar, capazes de promover a regeneração de tecidos de suporte perdidos como resultado de uma doença periodontal progressiva. Neste contexto, vários tipos de barreiras físicas têm sido sugeridos para uso em RTG e, as membranas biodegradáveis são de grande interesse, devido a essas evitarem o segundo procedimento cirúrgico para remoção da barreira. Assim, no presente estudo membranas de quitosana/gelatina com e sem glicerina foram desenvolvidas e o efeito do agente reticulante (glutaraldeído - GTA) foi analisado por dois métodos: imersão e vapor. O intumescimento das membranas foi realizada *in vitro* em tampão fosfato a 36°C e as membranas foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho (FTIR). No espectro de FTIR obtido a partir das membranas de quitosana/gelatina as bandas características de ambos os polímeros foram observados, indicando que houve interação entre a quitosana e a gelatina. Nos espectros obtidos a partir de membranas reticuladas, foi observado um deslocamento da banda a 1654 cm⁻¹, sugerindo efeitos do GTA. Nos resultados do ensaio de intumescimento foram observados que no início do processo a absorção de massa ocorreu rapidamente, atingindo o equilíbrio em 15 minutos. Observou-se também que para as membranas de quitosana/gelatina a taxa de intumescimento diminui com o aumento da concentração de GTA e isso foi mais pronunciado para as membranas sem glicerina (em ambos os métodos de reticulação). Ademais foi observado que o método de reticulação por imersão confere as membranas menor grau de intumescimento, quando comparada com os resultados obtidos através da reticulação por vapor. Entretanto, as membranas reticuladas por vapor são mais resistentes à fragmentação, mostrando-se superiores no ponto de vista morfológico, podendo apresentar melhor estabilidade biológica. Dentre as condições estudadas, as membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por vapor apresentaram características como flexibilidade e facilidade de manuseio, sugerindo que estas membranas podem apresentar boas características para uso em RTG.

Palavras chave: quitosana, gelatina, glutaraldeído, membranas, intumescimento, RTG

ABSTRACT

OLIVEIRA, Ana Paula Ramos de. **Development of chitosan/gelatin membranes and the study of crosslinking process.** 2013. 70f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/ FMRP/ IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The biofilm buildup within the sub gingival areas can lead to vascular and cellular responses, which can result in periodontal disease. Chronic periodontitis are chronic inflammation and progressive, clinically characterized by gingival inflammation, bleeding on probing, decreased resistance of the periodontal tissues on probing, gingival attachment loss and alveolar bone. In studies of lesions occurring in the alveolar process, it is observed that these often heal with fibrous tissue rather than bone. The guided tissue regeneration (GTR) is one of the treatments to replenish new tissue using a membrane as a barrier of physical protection of the defective area by preventing the invasion of other tissues and allowing repopulation selective root surface by cells of the periodontal ligament and alveolar bone, capable of promoting the regeneration of supporting tissues lost as a result of progressive periodontal disease. In this context, various types of physical barriers have been suggested for use in GTR and the biodegradable membranes are of great interest, due to avoid second surgical procedure for removal the barrier. Thus, in this study, chitosan/gelatin membranes, with and without glycerin were developed and the effect of cross-linked (glutaraldehyde) was analyzed by two methods: immersion and vapour. The swelling of these membranes was performed *in vitro* in saline at 36°C and the membranes were characterized by FTIR spectroscopy. In the FTIR spectrum obtained from chitosan/gelatin membrane bands features of both polymers were observed, indicating interaction between chitosan and gelatin. In the spectra obtained from membranes crosslinked, was observed a shift of the band at 1409 cm^{-1} to 1380 cm^{-1} associated with angular deformations of C-H, suggesting effect of glutaraldehyde. In the curves of swelling were observed that at the beginning the process of mass absorption occurred rapidly, reaching equilibrium in approximately 15 minutes. It was also observed that for chitosan/gelatin membranes the percentage of swelling decreases with increasing concentration of glutaraldehyde and this was more pronounced for membranes without glycerin (for both crosslinked methods). In addition it was noted that the immersion method immersion gives a lower degree of swelling, when compared with the results obtained by vapour crosslinking. However, vapour crosslinked membranes are more resistant to fragmentation, showing up higher in the morphological point of view, and may have better biological stability. Furthermore the membranes chitosan/gelatin/glycerin vapour crosslinked are flexible and ease of handling, suggesting that these these membranes have good characteristics for use in GTR.

Keywords: membranes, polymer, tumescence, GRT.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|--------|---|
| FTIR | Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier |
| G | Gelatina |
| Gl | Glicerina |
| GTA | Glutaraldeído |
| k | Constante de difusão |
| m | Massa |
| P | Intumescimento |
| PA | Proantocianidinas |
| PBS | Tampão fosfato |
| Q | Quitosana |
| ROG | Regeneração óssea guiada |
| RTG | Regeneração tecidual guiada |
| t | Tempo |
| v | Volume |
| η | Expoente difusional |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. | REVISÃO DA LITERATURA..... | 14 |
| 2.1 | Quitosana..... | 14 |
| 2.2 | Gelatina | 16 |
| 2.3 | Mistura da quitosana e gelatina | 17 |
| 2.4 | Glicerina | 20 |
| 2.5 | Glutaraldeído | 21 |
| 3. | OBJETIVOS GERAIS..... | 24 |
| 3.1 | Objetivos específicos..... | 24 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | Materiais | 25 |
| 4.2 | Preparo das membranas | 25 |
| 4.3 | Preparo das membranas de quitosana/gelatina contendo glicerina | 25 |
| 4.4 | Preparação das membranas reticuladas | 26 |
| 4.5 | Neutralização das membranas | 26 |
| 4.6 | Caracterização | 27 |
| 4.6.1 | Avaliação qualitativa..... | 27 |
| 4.6.2 | Espectroscopia na região do infravermelho..... | 27 |
| 4.6.3 | Ensaio de intumescimento | 28 |
| 4.6.4 | Análise dos dados de intumescimento | 29 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 31 |
| 5.1 | Caracterização das matérias-primas | 31 |
| 5.2 | Caracterização das membranas | 32 |
| 5.2.1 | Avaliação qualitativa..... | 32 |
| 5.2.2 | Espectroscopia na região do infravermelho..... | 36 |
| 5.3 | Ensaio de Intumescimento..... | 42 |
| 5.3.1 | Membranas quitosana e gelatina | 43 |
| 5.3.2 | Membranas reticuladas por imersão | 44 |
| 5.3.2.1 | Membranas quitosana/gelatina | 44 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.3.2.2 | Membranas quitosana/gelatina/glicerina | 47 |
| 5.3.3 | Membranas reticuladas por vapor..... | 49 |
| 5.3.3.1 | Membranas quitosana/gelatina | 49 |
| 5.3.3.2 | Membrana quitosana/gelatina/glicerina..... | 51 |
| 5.4 | Análise do comportamento de intumescimento das membranas..... | 53 |
| 6. | CONCLUSÕES | 59 |
| 7. | SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS | 60 |
| | REFERÊNCIAS | 61 |

1. Introdução

Os dentes são órgãos acessórios do sistema digestório, possuindo importante função na mastigação, cortando, moendo e misturando os alimentos (GUYTON, 1989; ERHART, 1987). Estes estão implantados nos arcos alveolares da maxila e mandíbula e, quando se acumula biofilme dental (placa bacteriana) no interior das áreas subgengivais do periodonto pode ocorrer respostas celulares e vasculares podendo resultar na doença periodontal (MONBELLI, 2003). A instalação e progressão desta doença envolvem um conjunto de processos imunopatológicos e inflamatórios, tendo a participação de fatores genéticos, ambientais e sistêmicos.

A doença periodontal define várias doenças associadas com o periodonto (STEINBERG e FRIEDMAN, 1988) e afeta com alta prevalência na população mundial, sendo a maior fonte de perda de dente após os 25 anos de idade (DEASY et al, 1989). As periodontite crônicas são inflamações crônicas e progressivas, caracterizadas clinicamente por inflamação gengival, sangramento à sondagem, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem (bolsas periodontais), perda de inserção gengival e do osso alveolar (FLEMMING, 1999; LINDHE et al, 2005)

A falta de higiene bucal é o primeiro fator responsável pela causa da periodontite. Adicionalmente, elementos como o fumo, o uso de drogas lícitas e ilícitas, a presença de algumas espécies periodonto patogênicas são fatores de risco para a doença periodontal (GENCO et al, 1996; KERDVONGBUNDIT e WIKESJO, 2002; MARQUES et al, 2001; SALLUM et al, 2007). A diabetes também está relacionada à doença periodontal, sendo considerada a sexta complicação clássica do diabetes (KAWAMURA, 2002). Essas doenças apresentam uma associação bidirecional, na qual o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes (WEHBA et al, 2004). Além disso, uma parte da população apresenta perda óssea progressiva em torno de 0,1 a 0,2 mm/ano, que podem ser provocados por diferentes tipos de traumas (GOIATO et al, 2005; PIATTELLI et al, 1996).

Assim, a identificação dos fatores de risco da doença periodontal é importante para definir o tratamento desta entidade clínica. Ademais, o controle desta doença é de extrema importância, pois além das perdas dentárias, estudos indicam que esta se apresenta como uma forma de reservatório e disseminação de bacteriemias, possuindo consequências sistêmicas, como em doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, nascimentos prematuros, nascimento

de crianças com baixo peso, restrição do crescimento fetal e no controle glicêmico da diabetes (BRUNETTI, 2004; PASSINI JUNIOR et al, 2007; ZINA et al, 2005). No entanto, a eficácia dos tratamentos convencionais das doenças bucais é reduzida em virtude da retenção das formulações aplicadas na cavidade oral serem limitada, uma vez que o fluxo salivar, a deglutição e a mastigação podem efetuar a diluição ou deslocamento da forma farmacêutica (OLYMPIO et al, 2006). Ademais, em estudos das lesões que ocorrem nos processos alveolares, observa-se que frequentemente estas cicatrizam com tecido fibroso ao invés de tecido ósseo (LOE, 1986).

A regeneração tecidual guiada (RTG) é um dos tratamentos para reconstituir novos tecidos usando uma membrana como barreira de proteção física da área defeituosa, impedindo a invasão de outros tecidos, especialmente dos tecidos conjuntivos fibrosos e permitindo a repopulação seletiva na superfície radicular por células do ligamento periodontal e osso alveolar, capazes de promover a regeneração dos tecidos de suporte (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) perdidos como consequência evolutiva da doença periodontal. A regeneração óssea guiada (ROG) é comumente compreendida como uma técnica cirúrgica que visa melhorar um defeito ósseo em determinada região através da formação de um novo osso. Esta técnica baseia-se nos princípios onde o tipo de tecido que se desenvolve em um determinado espaço depende das células que o povoam. Assim, a técnica de ROG visa à exclusão dos tecidos moles com a utilização de barreiras permitindo com que apenas as células ósseas povoem a região a ser regenerada (MELCHER, 1970, KARRING et al, 1984).

Em cirurgias reconstrutivas, a utilização de barreira física é um procedimento comum que visa à regeneração periodontal e do rebordo ósseo, logo as membranas empregadas na RTG, desempenham importante papel na obtenção de bons resultados (MACEDO et al, 2003). Hardwick et al, 1994 estabeleceram algumas características desejáveis para os materiais utilizados na técnica de RTG, que são: biocompatibilidade, oclusividade celular, integração tecidual, capacidade de criar espaço e facilidade de manipulação.

Neste contexto, vários tipos de barreiras físicas têm sido sugeridos para o uso na RTG, (KIKUCHI et al, 2004), sendo classificadas em duas categorias: reabsorvíveis e não reabsorvíveis. Alguns exemplos de não reabsorvíveis são: membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE – PVC) e membrana de celulose (filtro de Millipore). Exemplos de membranas reabsorvíveis são: membranas de colágeno, membranas de ácido polilático e/ou poliglicólico, membrana de monômero de fibrina e elastina (LINDHE et al, 1995; BOGLE et al, 1997; WANG e MACNEIL, 1998). De acordo com a literatura, os resultados clínicos são semelhantes entre as membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis. No caso da utilização das

membranas não reabsorvíveis a desvantagem seria a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para a remoção da membrana, quatro a seis semanas após a primeira cirurgia (CRUZ et al, 1993; GARRETT, 1996; KIKUCHI et al, 2004.). Para o uso das membranas reabsorvíveis a estabilidade da membrana e o tempo de absorção da mesma são fatores que devem ser estudados (GOTTLOW, 1993). A taxa de degradação *in vivo* é determinada por uma série de fatores como peso molecular, composição química, características físicas e de superfície, espessura, porosidade e resposta tecidual do hospedeiro. Ademais, existem os polímeros biologicamente degradáveis, que tendem a se fragmentar em unidades menores dentro do corpo são classificados como biodegradáveis e bioreabsorvíveis.

A gelatina, derivada do colágeno parcialmente desnaturado, é uma proteína solúvel e suas propriedades atrativas, tais como, excelente biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, plasticidade, boa aderência e excelente crescimento celular fazem desta um primoroso biomaterial para a engenharia de tecido. Segundo Agrawal e Athanasiou (1997) a gelatina a base de colágeno possui um grau elevado de grupos funcionais biológicos e possui algum potencial para aplicações em *scaffolds* de tecido. A membrana de colágeno possui excelente afinidade celular e biocompatibilidade para regenerar tecidos; por outro lado, dependendo da aplicação da gelatina e das blendas compostas de gelatina, se faz necessário a reticulação destes sistemas com o intuito de controlar a solubilidade dos polímeros em água e melhorar as propriedades mecânicas (TOMIHATA e IKIDA, 1997). Em termos práticos, a gelatina é usada atualmente em produtos farmacêuticos, devido a sua excelente viabilidade celular e falta de antigenicidade e a sua disponibilidade, de formas e baixo custo facilitam a seletividade e produção em grande escala (SINGH et al, 2002), porém, sua resistência mecânica é normalmente muito baixa, a taxa de absorção das membranas de gelatina é mais rápida e de difícil competição com o processo de cicatrização do tecido normal (CAMPOS JUNIOR, 2003).

Outro material que merece destaque é a quitosana (SHAHIDI et al, 1999; RABEA et al, 2003), atualmente a quitosana vem sendo bastante utilizada na produção de cosméticos, medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais, tanto na medicina como na odontologia (SINGLA e CHAWLA, 2001). A quitosana é um polímero formado por longas cadeias de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, sendo proveniente da reação de desacetilação parcial da quitina. As propriedades de retenção de água e biodegradabilidade da quitosana podem ser controladas também por ligações cruzadas entre suas cadeias. Desse modo, o tratamento deste polímero com agentes reticulantes pode melhorar a estabilidade e a resistência mecânica (LARANJEIRA e

FÁVERE, 2009; OSHITA et al, 2003).

Assim, uma vez que o tempo de degradação dos polímeros naturais pode ser um fator limitante para o seu uso em RTG e que os parâmetros e os agentes que podem levar a reticulação da quitosana e de misturas feitas utilizando-se este polímero não estão completamente definidos, trabalhos que visam estudar agentes reticulantes que podem conferir características desejáveis aos polímeros naturais e suas misturas, como membranas de quitosana/gelatina, para empregá-los em RTG são bem vindas. A degradação dos materiais reabsorvíveis não deve interferir na regeneração óssea e a dissolução desses materiais deve ocorrer em um tempo compatível com o processo de regeneração, pois estes podem intervir na eficácia do tratamento.

2. Revisão da literatura

2.1 Quitosana

A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais ubíquo, depois da celulose (DUTTA et al, 2002), podendo ser obtida de fontes naturais como crustáceos, moluscos, insetos, aracnídeos, fungos e algas. A quitosana é extraída por hidrólise ácida da quitina e é um polímero formado por longas cadeias de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. A quitosana é a forma desacetilada da quitina e são definidas como copolímeros de unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, respectivamente (SHAHIDI et al, 1999; RABEA et al, 2003). As duas características que melhor diferenciam os dois copolímeros são o grau de desacetilação e a massa molar. Comercialmente a quitosana apresenta um grau de desacetilação variando entre 70% e 90% e a massa molar na faixa de 10^4 - 10^6 g. mol⁻¹ (DOMARD e RINALDO, 1983). A Figura 1 apresenta uma representação das estruturas idealizadas de quitina e quitosana, respectivamente.

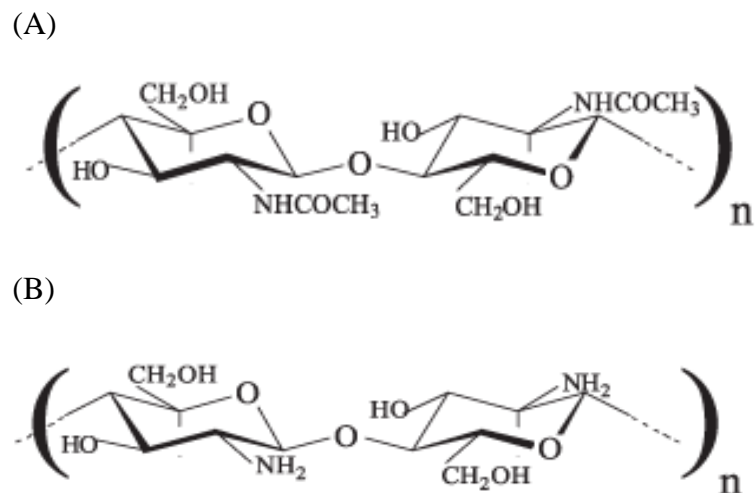


Figura 1: Representação das estruturas de (A) quitina e (B) quitosana. Adaptado da fonte BATTISTI e CAMPANA FILHO, 2008.

A quitina é insolúvel em solução aquosa e em solventes orgânicos. Em contraste, a quitosana é solúvel em soluções de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido fórmico e cítrico) e ácidos inorgânicos diluídos (ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido per clórico ou fosfórico) em pH menor que 6,0 e insolúvel em água, ácidos concentrados, álcool e acetona (MATHUR e NARANG, 1990). Isso possibilita a quitosana ser mais adequada para propósitos práticos, como aplicações biológicas (DASH et al, 2011).

A quitosana quando solubilizada em meio ácido dá origem a soluções viscosas. Essa característica está relacionada à quantidade de grupos amina que se encontram protonados (NH_3^+) responsáveis pelo processo de repulsão eletrostática entre cadeias e pelo processo de solvatação em água. A constante de equilíbrio (pKa) dos grupos (NH_3^+) é de aproximadamente 6,5. No entanto, quando as soluções de quitosana têm o pH elevado observa-se a formação de um precipitado gelatinoso em forma de flocos (CHEN, 1996), que assume comportamento de polieletrólito com alta densidade de carga. Assim, tem-se uma carga positiva para cada unidade de glicosamina, o que favorece a atividade deste material sobre materiais como as proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos graxos e outros, por apresentarem carga negativa (DOMARD, 1997).

As principais características que fazem da quitosana um polissacarídeo de grande interesse para um número expressivo de aplicações são: possibilidade de ser quimicamente modificada; possibilidade de ser processada em diferentes formas (soluções, esponjas, filmes, membranas, gel, entre outros) e de ser um polieletrólito em meio ácido (KUMAR, 2000). Além disso, a quitosana e seus derivados têm sido amplamente estudados em termos da atividade antimicrobiana, apresentando bons resultados como inibidor do crescimento de bactérias, fungos e leveduras (RABEA et al, 2003; TSAI, 1999); efeito influenciado pelas características físicas das soluções, como o grau de desacetilação, peso molecular, concentração, tempo de exposição, viscosidade e pH (SILVA, 2005).

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nas últimas décadas. Propriedades como biocompatibilidade e a biodegradabilidade possibilitaram diversas aplicações para este biomaterial. A versatilidade da quitosana possibilita que esta seja utilizada na indústria de alimentos, engenharia de tecidos, indústria farmacêutica, áreas médicas e odontológicas (KUMAR, 2000; SPIN-NETO et al, 2008).

Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, material de bandagem, molde para enxerto de pele, material para sutura e lentes de contato, agente hemostático e cicatrizador. Como agente hemostático, a quitosana atua como barreira física, impedindo a passagem de células epiteliais e atuando como barreira semipermeável,

que permite a passagem de nutrientes e a troca de gases. Como agente cicatrizador, este polímero natural pode ser utilizado para inibir a fibroplasia na cicatrização de feridas e para promover o crescimento e diferenciação de tecidos em cultura de tecidos (KUMAR, 2000).

Na área odontológica, estudos empregando este biomaterial foram feitos, primeiramente, utilizando-o na forma de gel, com o intuito de avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica (GERENTES et al, 2002). Polímeros de quitosana vêm sendo testados com sucesso no tratamento de lesões ósseas periodontais e defeitos ósseos (MUZZARELLI et al, 1994; PARK et al, 2003). Membranas feitas de quitosana têm apresentado potencial para utilização em técnicas de regeneração tecidual guiada. Estudos sugerem que o período de degradação depende do grau de desacetilação da quitosana, fator que também interfere na resistência mecânica do biomaterial avaliado, e a possibilidade de associação de outras substâncias à quitosana nas membranas (ZHANG et al, 2007).

2.2 Gelatina

Outro importante biopolímero bioreabsorvível é a gelatina, a gelatina é uma proteína, de alta massa molar, ausente de triptofano, pobre em tirosina, cistina e metionina, rica em glicina, 4-hidroxiprolina e prolina (ZIEGLER e SGARBIERI, 2009), obtida pela hidrólise ácida ou alcalina do colágeno componente protéico básico da pele, ossos e cartilagem de animais (DJANGNY et al, 2001).

A gelatina, ao contrário do colágeno, é solúvel; sendo também denominada de colágeno hidrolisado (DJANGNY et al, 2001). A conversão do colágeno em gelatina é feita geralmente em cinco etapas: lavagem, extração, purificação, concentração e secagem. A preparação industrial da gelatina envolve hidrólise controlada para obter a gelatina solúvel através de um dos métodos de tratamento (ácida ou alcalina) da matéria-prima, seguido de tratamento térmico que se obtém dois diferentes tipos de gelatina. A gelatina do tipo A é obtida pelo pré-tratamento em meio ácido (pH 3,8-6,0) antes da desnaturação térmica, enquanto a gelatina do tipo B é obtida através do pré-tratamento alcalino (pH 4,7-5,3). No pré-tratamento alcalino, os grupos amida dos resíduos de glutamina e asparagina são convertidos em ácido glutâmico e ácido aspártico, que permite um conteúdo de 25% a mais de

ácido carboxílico para a gelatina do tipo B em comparação com a do tipo A (SINGH et al, 2002).

A gelatina é um hidrocolóide extremamente versátil, produzido em abundância e de baixo custo, suas principais características são: a solubilidade em água e a capacidade de formação de gel termo-reversível, além da capacidade de formar filmes flexíveis, sendo muito utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica, entre outras (AGRAWAL e ATHANASIOU, 1997; BIGI et al, 2000;). Além disso, devido sua excelente biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, plasticidade, boa aderência e excelente crescimento celular fazem desta um primoroso biomaterial para a engenharia de tecido (AYALA, MALINCONICO e LAURIENZO, 2008).

Proteínas e polissacarídeos têm sido utilizados para a produção de filmes bioreabsorvíveis, biofilmes feitos de polissacarídeos, como quitosana, apresentam boa barreira a gases (oxigênio e gás carbônico), mas não a água, provavelmente relacionada à alta polaridade deste tipo de filme. Os biofilmes a partir de proteínas, como gelatina são boas barreiras ao oxigênio e gás carbônico em ambientes com baixa umidade relativa, mas não em alta umidade devido à susceptibilidade do filme em absorver umidade e se dissolver. Assim, uma vez que estes apresentam alta susceptibilidade à umidade, a reticulação pode conferir resistência a água e melhorar a estabilidade térmica e mecânica destes biopolímeros. Além disso, filmes compostos estão sendo investigados, a fim de melhorar as características de permeabilidade, força, flexibilidade, entre outras. Propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina podem ser melhoradas utilizando aditivos, tais como polióis ou carboidratos de alto peso molecular, como amido e quitosana (ANKER et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2012).

2.3 Mistura da quitosana e gelatina

Entre os polímeros reabsorvíveis, os biopolímeros quitosana e gelatina apresentam características interessantes para serem utilizados para obtenção de membranas para RTG (YUAN et al, 2003). Ademais estudos encontrados na literatura científica mostram a versatilidade dos compostos de quitosana e gelatina (YANG et al, 2010; TAN et al, 2007; KIM et al, 2005; ROCASALBASA et al, 2013; RIGO et al, 2010; GRANATO et al, 2009.)

No trabalho desenvolvido por Yang e colaboradores, 2010, foi realizado o preparo de

hidrogeis híbridos de gelatina/carboximetil quitosana utilizando reticulação induzida por radiação. Os hidrogeis apresentaram excelente capacidade de retenção de água e módulo de compressão semelhante ao do tecido mole, características favorecidas devido à miscibilidade entre gelatina e as moléculas carboximetil quitosana. Esses hidrogeis híbridos têm maior flexibilidade, maior capacidade de absorção de água e melhor atividade antimicrobiana do que os hidrogeis de gelatina. Ainda no estudo de degradação *in vitro* revelaram que os hidrogeis podem ser completamente hidrolisados em tampão fosfato (PBS), em lisozima, e em soluções de colagenase, indicando excelente biodegradabilidade. Experiências com cultura de células demonstraram que os hidrogeis híbridos de gelatina/carboximetil quitosana não possuem citotoxicidade e apresentam boa citocompatibilidade. Deste modo, as células de fibroblastos NIH 3T3 cresceram ativamente nos hidrogeis. Em vista disso, os resultados obtidos no estudo sugerem o potencial dos hidrogeis na aplicação de materiais para cicatrização de feridas.

Kathuria e colaboradores, 2009, desenvolveram um *scaffold* de quitosana/gelatina utilizando o processo *cryogel*, técnica pela qual o material de natureza elástica desenvolvido não apresenta falha quando é submetido à tensão. Os estudos mecânicos mostraram que os *scaffolds* de quitosana/gelatina obtidos mediante a técnica de *cryogel* não se romperam mesmo após vários ciclos de tensão, apresentaram uma morfologia porosa interligada que permitia o fluxo de nutrientes e resíduos, apresentaram biocompatibilidade com as células de fibroblastos através da adesão celular, proliferação e secreção de matriz extracelular. Deste modo, de acordo com os autores essas matrizes apresentam potencial para formar a cartilagem na engenharia de tecidos.

Outro exemplo da utilização da mistura de quitosana e gelatina foi a pesquisa desenvolvida por Tan et al, 2007, onde além da quitosana e da gelatina, o ácido hialurônico também foi empregado para o desenvolvimento de um *scaffold* com estrutura que imita a composição e microambiente da matriz da cartilagem natural. Neste caso o *scaffold* foi obtido mediante a técnica de liofilização e segundo os autores, apresentou uma estrutura relativamente estável quando foi realizada a incorporação da heparina. Quando esse material foi analisado *in vitro*, foi observado que os condrócitos tiveram uma distribuição uniforme ao longo do *scaffold*. Dessa forma, os autores concluíram que, juntamente com a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, o material desenvolvido pode ser um bom candidato para substituição de cartilagem na engenharia de tecidos.

Kim e colaboradores, 2005, no estudo realizado com membranas de quitosana/gelatina reticuladas com proantocianidinas (PA) demonstraram a funcionalidade dessa mistura, através das análises dos espectros na região do infravermelho. Foi possível verificar a formação da

rede reticulada de gelatina e quitosana, em decorrência da utilização do agente reticulante PA, cuja função é o de se ligar mediante ligações éster e amida. A reticulação conferiu melhores propriedades mecânicas, além de maior estabilidade térmica quando comparadas com as membranas de gelatina e de quitosana/gelatina sem a reticulação. No ensaio *in vitro*, utilizando digestão da protease, os autores mostraram que os filmes reticulados com PA não são tóxicos além de terem melhor capacidade de suportar a adesão e proliferação de células com relação às membranas reticuladas de gelatina ou de quitosana apenas. Estes resultados, de acordo com os autores, sugerem que o composto quitosana/gelatina/proantocianidina é uma matriz promissora para aplicações na engenharia de tecidos.

Rocasalbasa e colaboradores, 2013, visam o desenvolvimento de um hidrogel bioativo para curativo. Os autores estudaram a reticulação e funcionalização simultânea e assistida da lacase (enzima existente na laca e outras plantas, que tem a propriedade de ocasionar a oxidação de certos fenóis) com misturas de quitosana/gelatina com compostos fenólicos de *Hamamelis virginiana*. A oxidação da lacase entre os fenóis resultou em uma rede de biopolímero estabilizada por quinonas e pelas reações de acoplamento do grupo amino. As propriedades físico-mecânicas dos hidrogéis de quitosana/gelatina e compostos fenólicos apresentaram-se estáveis sob condições fisiológicas e resistentes à degradação por lisozima. A inibição das enzimas das feridas crônicas deletérias foi em grande parte dependente da quantidade de compostos fenólicos liberados, sendo responsável pela inibição da atividade da mieloperoxidase na qualidade de substratos de enzimas. Por outro lado, a inibição parcial da atividade da colagenase foi devido a ambos os compostos fenólicos. Além disso, os hidrogéis montados enzimaticamente inibiu o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *P. aeruginosa* comumente encontrados em feridas crônicas.

Atualmente, nosso grupo de pesquisa, coordenado pela Prof. Dr. Eliana Cristina da Silva Rigo, tem realizado estudos empregando a mistura da quitosana e gelatina e da mistura associada a outros compostos químicos como hidroxiapatita e prata (RIGO et al, 2010; GRANATO et al, 2009). Os estudos têm como intuito desenvolver materiais a fim de serem empregados na regeneração tecidual guiada. Neste sentido, análises físico-químicas e testes de biocompatibilidade e citotoxicidade são realizados.

2.4 Glicerina

A glicerina é uma substância atóxica, sendo utilizada na indústria de alimentos como aditivo em alimentos e em alimentos enlatados, sendo empregada em função de suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes e na indústria farmacêutica utilizados em xaropes, devido à sua alta viscosidade. A glicerina também tem sido empregada como plastificante, para reduzir a fragilidade de filmes, como os formados a partir de polímeros e polissacarídeos (GONTARD et al, 1993). Recentemente novas aplicações da glicerina e glicerol vêm sendo descobertas, como seu emprego como substrato para fermentações bacterianas com a finalidade de se obter produtos de alto valor agregado como polímeros biodegradáveis, raminolipídeos, biosurfactantes, dentre outros (ARRUDA et al, 2007).

Outra característica é seu papel como osmorregulador; devido a isto a produção de glicerol pela célula acarreta em diminuição da permeabilidade da membrana e restabelecimento da atividade celular (NEVOIGT e STAHL, 1997; REP et al, 1999). Em virtude deste mesmo efeito, glicerina ou o glicerol é utilizado como agente purgativo e em função de sua rápida habilidade de contrabalancear a pressão hídrica, este pode ser empregado no tratamento de edemas cerebrais e glaucoma e da hipertensão intracranial (ARRUDA et al, 2007).

As características físico-químicas da glicerina que se destacam são a de ser um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções. Esta, porém, é pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (LOPES et al, 1999). A glicerina (1,2,3-propanotriol) é também denominada glicerol (REHM, 1988), no entanto, normalmente o termo glicerol refere-se ao composto puro e o termo glicerina à purificação de compostos comerciais que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (ARRUDA et al, 2007).

O glicerol é um poliálcool, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 2. As suas fontes metabólicas são numerosas. O glicerol está presente em espécies como os protistas unicelulares e mamíferos (BRISSON et al, 2001), nestas espécies é encontrado como um triglicerídeo combinado como, por exemplo, a ácidos graxos (oléico, palmítico e esteárico). O glicerol também pode ser encontrado em óleos ou azeites como o de coco, dendê, soja, algodão e oliva, bem como em gorduras de animais como a banha de porco e sebo, que pode ser liberado durante a digestão (ARRUDA et al, 2007; BRISSON et al, 2001).

Tradicionalmente, o glicerol é um subproduto da hidrólise de gordura na indústria de sabão. No entanto, esse processo não tem sido mais utilizado a nível industrial devido à substituição do sabão por detergentes (WANG et al, 2001). Atualmente há processos biotecnológicos para a produção de glicerol em adição a processos químicos sintéticos; o glicerol é formado através da via biofosfato de frutose (REHM, 1988; WANG et al, 2001).

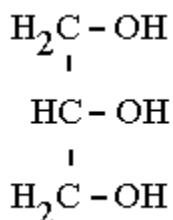


Figura 2: Fórmula estrutural do glicerol. Adaptado da referência ARRUDA et al, 2007.

2.5 Glutaraldeído

O glutaraldeído é um dialdeído alifático, fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, fórmula estrutural $\text{CHO} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CHO}$, cujas propriedades físicas no estado puro formam um líquido oleoso ou de cristais incolores. Este possui baixa viscosidade é solúvel em água e em solventes orgânicos. Por ser um produto muito reativo quimicamente pode se polimerizar na presença da água ou quando aquecido, oxida quando exposto ao ar, mas é estável na presença da luz (JAYAKRISHNAN e JAMEELA, 1996).

A molécula bifuncional do glutaraldeído interage fortemente com compostos que possuem grupos amino (NH_2) na sua estrutura e com menor intensidade com o grupo tiol. O mecanismo de reação do glutaraldeído com os grupos NH_2 está relacionado com a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos compostos originando a formação de uma base de *Schiff* ($\text{C}=\text{N}$) ou a formação de α hidroxiaminas (Figura 3), que por sua vez podem condensar com novos grupos amino para efetivar ligações cruzadas (GONSALVES et al, 2011). Entretanto, o glutaraldeído ao ser diluído em água, interage com as proteínas formando duplas ligações etilênicas conjugadas (WANG, 2004; MONTEIRO JUNIOR, 1999). Este fato ganha apoio pela estabilidade desta interação, que é irreversível e

resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado para interações que envolvem uma base de *Schiff* (MONTEIRO JUNIOR, 1999).

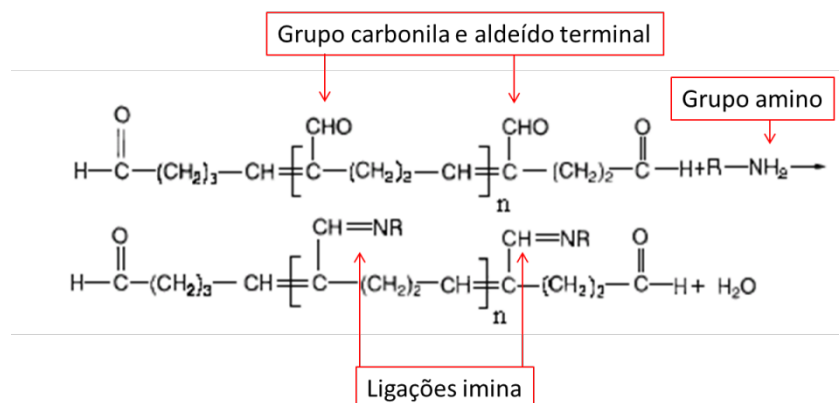


Figura 3: Reação de polimerização do glutaraldeído com aminas primárias. Adaptado da referência JAYAKRISHNAN e JAMEELA, 1996.

O glutaraldeído tem sido utilizado com mais frequência como um agente de ligação cruzada do que qualquer outro reagente, uma vez que é menos dispendioso, está prontamente disponível e é altamente solúvel em solução aquosa (JAYAKRISHNAN e JAMEELA, 1996; VIJAYARAGHAVAN et al, 2009; OFOKANSI et al, 2010). Reações de reticulação visam principalmente modificar determinadas propriedades de polímeros, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular (NETO et al, 2005), ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas (BERGER et al, 2004).

Em soluções de quitosana e gelatina, a reação química entre as matrizes poliméricas e o glutaraldeído acontece devido ao ataque nucleofílico dos grupos aminos (NH₂) da quitosana aos grupos carbonilas (-CO) presente no glutaraldeído. A ligação covalente formada entre os grupos amino do biopolímero e o aldeído terminal (RCOH) do glutaraldeído é considerado irreversível e por essa razão resiste a valores extremos de pH e temperatura. Segundo Monteiro Júnior e Airoidi, 1999, o mecanismo proposto forma uma base de *Schiff* (ligação imina) e sugeriram para interpretar este comportamento três hipóteses sendo:

1. a formação de uma base de *Schiff* entre o grupo aldeído com o grupo amino da quitosana, deixa o outro grupo aldeído livre e que seria utilizado para a uma determinada reação de interesse;

2. a reticulação é formada entre uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de grupo amino, resultando na formação de duas bases de *Schiff*, formando um ligação cruzada;
3. a reticulação é formada também por mais de uma molécula de glutaraldeído, devido à sua polimerização em determinadas condições, por exemplo, em altos valores de pH. Após a polimerização, ocorre a reticulação dos grupos amino da quitosana.

3. Objetivos gerais

Desenvolver e estudar o comportamento de membranas de gelatina/quitosana e gelatina/quitosana/glicerina, visando à aplicação como barreira física em Regeneração Tecidual Guiada

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver membranas de gelatina/quitosana contendo ou não plastificante (glicerina)
- ✓ Caracterizar as membranas desenvolvidas por espectroscopia na região do infravermelho
- ✓ Estudar o efeito do método de reticulação com glutaraldeído pelos métodos de imersão e por vapor.

4. Materiais e métodos

4.1 Materiais

A quitosana utilizada neste trabalho foi obtida comercialmente (Polymar), mínimo de 85% de quitina desacetilada, e utilizada sem tratamento prévio. A gelatina tipo B é de grau alimentício fornecida pela Gelita do Brasil Ltda. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Preparo das membranas

A solução de quitosana foi preparada em concentração 2% (m/v) em ácido acético 1% (m/v) sob agitação magnética por 30 minutos em temperatura ambiente. As partículas insolúveis foram removidas por filtração a vácuo, a solução foi armazenada a 4°C. Para preparar solução de gelatina, o pó foi dissolvido em água destilada a 40°C por 30 minutos, sob agitação magnética, de modo obter uma concentração de 4% (m/v). A solução de quitosana e gelatina foram obtidas na proporção de 1:1 (v/v), mantida em agitação magnética a temperatura ambiente por 1 hora.

Membranas quitosana (Q), gelatina (G), quitosana/gelatina (Q/G) foram obtidas, colocando-se 20 mL das soluções em placas de petri, as quais foram mantidas em estufa com circulação de ar a 30°C por 48h para secagem e evaporação do solvente.

4.3 Preparo das membranas de quitosana/gelatina contendo glicerina

A solução de quitosana/gelatina 1:1 (v/v) foi preparada como descrito anteriormente, em seguida glicerina (Gl) na proporção 0,5% (v/v) foi adicionada a essa solução e mantida sob agitação magnética por 1 hora, após esse período 20 mL dessa solução foi colocada em

placas de petri e levadas para uma estufa com circulação de ar a 30°C por 48h para secagem e evaporação do solvente.

4.4 Preparação das membranas reticuladas

Para isso as membranas foram tratadas com soluções de glutaraldeído em diferentes concentrações por dois métodos: imersão ou a vapor. No método de imersão, após a etapa de secagem as membranas de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/glicerina foram imersas em soluções de glutaraldeído (0,5, 1 ou 2% v/v) por 30 minutos. No método a vapor, em seguimento a etapa de secagem, as membranas obtidas foram colocadas no dissecador na presença de soluções de glutaraldeído (0,5, 1 ou 2% v/v) e mantidas a vácuo por 24 horas.

4.5 Neutralização das membranas

Após as etapas de reticulação, dois tratamentos distintos foram empregados separadamente, visando à neutralização do ácido acético. Assim, parte das membranas foram neutralizadas em solução de NaOH/etanol e, parte por evaporação do solvente. Na neutralização em solução de NaOH/etanol as membranas foram tratadas com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% por 30 minutos, lavadas com água destilada, secas em estufa a 30°C. Na neutralização por evaporação do solvente, as membranas foram colocadas em estufa à 60°C por 24 horas. Após ambos os processos, as membranas foram armazenadas a temperatura ambiente.

A Figura 4 apresenta um fluxograma do processo para obtenção das membranas.

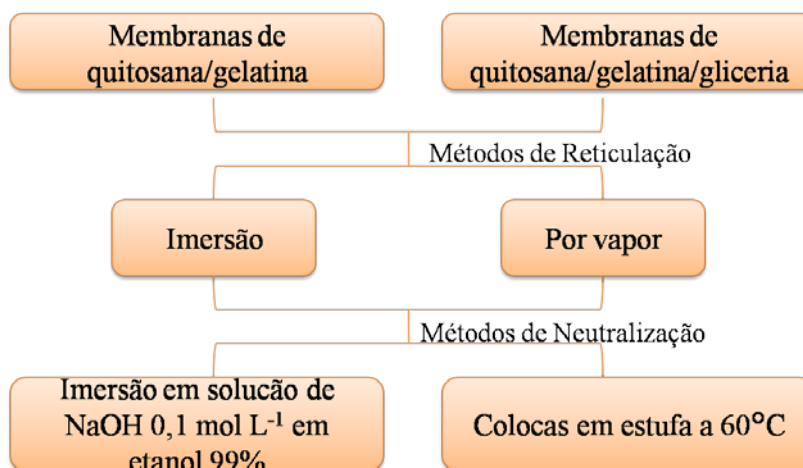


Figura 4: Esquema ilustrativo do processo de obtenção das membranas reticuladas.

4.6 Caracterização

4.6.1 Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa e dimensional foi executada através de observações visuais levando-se em consideração a cor, a rigidez e a flexibilidade das membranas obtidas, além de se verificar a espessura dos filmes que foi obtida com um micrômetro Mitotoyo. As medidas da espessura foram feitas em triplicata e a média e o desvio padrão foram calculados.

4.6.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite caracterizar bandas de absorção importantes de qualquer composto e é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de polímeros (BRUGNEROTTO et al, 2001). Esta técnica está baseada nas transições de estados vibracionais e pode monitorar a absorção de todas as ligações químicas de uma molécula, que tem uma vibração associada para cada ligação. A espectroscopia no infravermelho consiste de uma radiação na região do infravermelho do espectro

eletromagnético passando através da amostra. Parte desta radiação é absorvida pela amostra e parte é transmitida. Deste modo o espectro resultante pode ser expresso em termos da absorção ou da transmissão, criando uma impressão digital molecular da amostra (KAWANO, 2007).

Neste contexto, a técnica espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), por transmitância, foi utilizada para avaliação da presença de grupos químicos das matrizes poliméricas e da mistura quitosana/gelatina, bem como das membranas obtidas pelos métodos de reticulação.

Para obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho das matérias primas as amostras da solução quitosana, gelatina e quitosana/gelatina 1:1 (v/v), preparadas conforme descrito anteriormente, foram gotejadas em suporte de silício e secas em estufa a vácuo. As medidas foram feitas em um Espectrofotômetro Bomem MB-102 (FTIR), com acúmulo de 32 varreduras, na faixa de operação de $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, no Instituto de Química de São Carlos. Os espectros das membranas reticuladas foram obtidos em um Espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum GX por reflectância difusa com transformada de Fourier DRIFT na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} resolução de 4 cm^{-1} durante 10 varreduras no Laboratório de Materiais Vítreos – LAMAV, do Departamento de Engenharia de Materiais - DEMA da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos.

4.6.3 Ensaio de intumescimento

As propriedades hidrofílicas das membranas obtidas foram estudadas por medidas de taxa de intumescimento (P) em função do tempo. O intumescimento é descrito como o aumento no volume do polímero quando este está imerso em um determinado solvente, ou também pode ser determinado a partir da quantidade da massa de fluido absorvida pelo polímero em relação a sua massa inicial (CAMPOS et al, 2005; NETO, 2005; RATNER, 1996; ZHANG, 2007).

O grau de intumescimento foi obtido com PBS (tampão de fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) à temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. O PBS foi obtido dissolvendo o preparado obtido da Sigma Aldrich (USA) em água Milli-Q. Para a determinação do grau de

intumescimento as amostras em triplicatas foram inicialmente pesadas e imersas em recipientes contendo o PBS, pH 7,4, por distintos períodos de tempo. Após a finalização desses períodos, as amostras foram retiradas das soluções, colocadas em papel de filtro para a retirada do excesso de líquido e pesadas novamente. A quantidade de água adsorvida foi calculada utilizando a Equação 1 (LIU et al, 2005)

$$P(\%) = 100 \frac{(P_u - P_s)}{P_s} \quad \text{Equação 1}$$

Onde P_u e P_s são as massas (em gramas) das amostras úmidas e secas, respectivamente.

Os ensaios de intumescimento foram realizados na UNESP de São José do Rio Preto sobre autorização do Prof. Dr. Manônio Lopes Cornélio do Departamento de Física.

4.6.4 Análise dos dados de intumescimento

As características de intumescimento de polímeros podem ser analisadas por parâmetros associados à quantidade de solvente absorvido pela matriz polimérica em função do tempo. Assim, alguns parâmetros relacionados ao intumescimento foram obtidos por meio das medidas de taxas de intumescimento em função do tempo (P vs t). Para cada curva P vs t , o expoente difusional (η) e a constante de difusão (k) foram calculados utilizando a Equação 2 (AOUADA et al, 2009). O estudo dos parâmetros de intumescimento permite estudar sistemas nos quais o comportamento de absorção de massa do sistema polimérico não é conhecido. Deste modo, os parâmetros associados ao intumescimento são importantes no entendimento mecanístico do processo de difusão da água para o interior dos polímeros (SRIAMORNSAK et al, 2007).

$$P = \frac{M_t}{M_{eq}} = kt^\eta$$

Equação 2

Onde M_{eq} é a massa da membrana (em gramas) no equilíbrio de intumescimento e t é o tempo (em segundos).

Para o cálculo de η e k deve-se fazer um gráfico de $\ln P$ vs $\ln t$. Sendo que o valor do expoente difusional é o coeficiente angular da curva e o coeficiente linear é $\ln k$. Essa relação pode ser aplicada apenas na região linear da curva $\ln P$ vs $\ln t$, ou seja nos estágios iniciais do intumescimento, onde a curva segue essa tendência (AOUADA et al, 2009).

5. Resultados e discussões

5.1 Caracterização das matérias-primas

A Figura 5 mostra os espectros das soluções de quitosana, gelatina e quitosana/gelatina 1:1 (v/v). No espectro da quitosana (Figura 5 A) as bandas entre 800-1200 cm^{-1} são características das estruturas de sacarídeos e a banda em torno de 1080 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-O, característica de ligação dos anéis piranosídicos de quitosana. Além disso, neste espectro observam-se as bandas: em 1380 cm^{-1} devido a deformações angulares de C-H; 1556 cm^{-1} relacionada com a deformação angular N-H (amida II); 1652 cm^{-1} correspondem ao estiramento C=O da amida I, uma vez que a quitosana deriva de um processo de desacetilação elevado; 3370 cm^{-1} , associada ao N-H, a ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H (BRUGNERTTO et al, 2001; JOSUÉ et al, 2000; SHIGEMASA et al, 1996; WANG et al, 2004). No espectro referente à gelatina (Figura 5 B) observam-se as seguintes bandas principais: 1556 cm^{-1} devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N (amida II); 1656 cm^{-1} devido ao estiramento da carbonila (amida I); 1230 e 1446 cm^{-1} correspondem às vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e em torno de 3290 cm^{-1} corresponde ao estiramento O-H (AEWSIRI et al, 2009; LIU et al, 2012; MUYONGA et al, 2004).

No espectro obtido partir da mistura quitosana/gelatina (Figura 5 C) os picos referentes à quitosana e à gelatina estão presentes, indicando interação entre os polímeros. Os picos referentes à amida I, II tiveram um deslocamento para menores números de onda (1650, 1550 cm^{-1} , respectivamente). Tipicamente, uma diminuição no comprimento de onda vibracional e um alargamento das bandas de vibração O-H e N-H são indicativos de uma interação de ligação de hidrogênio entre as moléculas de polímero no filme. No entanto, neste verifica-se um ligeiro deslocamento para maior número de onda (3290 e 3313 cm^{-1}) das deformações de O-H e N-H, possivelmente em virtude de uma menor formação de ligações de hidrogênio, indicando que uma interação hidrofóbica estava envolvida na rede molecular da gelatina e quitosana (KIM et al, 2005; LIU et al, 2012; XIE et al, 2006, YANG et al, 2010).

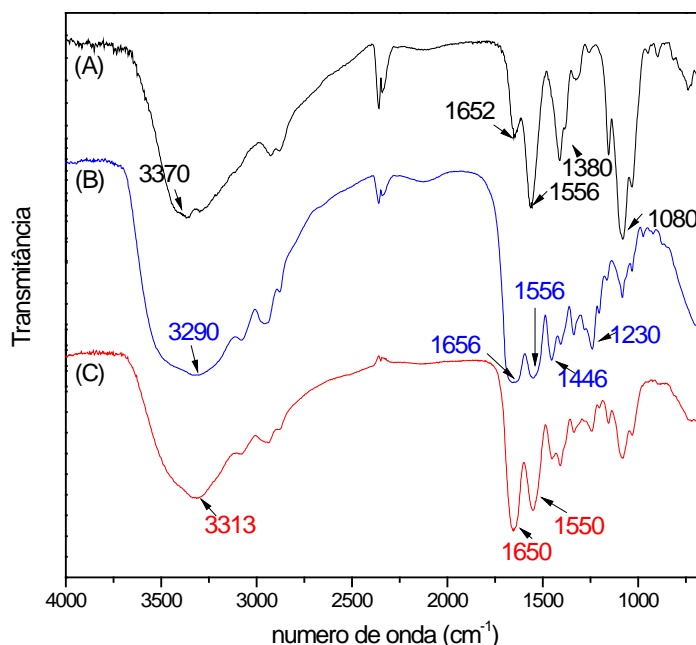


Figura 5: Espectro na região do infravermelho obtidos da (A) quitosana, (B) gelatina e (C) quitosana/gelatina na proporção 1:1 (v/v).

5.2 Caracterização das membranas

5.2.1 Avaliação qualitativa

As Figuras de 6 a 10 apresentam a imagem fotográfica das membranas de quitosana (Q), gelatina (G) e da mistura Q/G com e sem adição de glicerina (Gl). A Figura 6 mostra a imagem das membranas de Q e G puras e da mistura Q/G e Q/G/Gl sem reticulação (Figura 6). As Figuras 7 e 8 apresentam as imagens das mesmas membranas agora reticuladas pelo método de imersão nas soluções de GTA com 0,5%, 1% e 2% (v/v) e as Figuras 9 e 10 para as amostras reticuladas pelo método de vapor com soluções de GTA também nas concentrações de 0,5%, 1% e 2% (v/v). Nas Figuras de 7 a 10 também são mostradas as membranas que além de reticuladas, foram neutralizadas por: imersão em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou mantidas em estufa a 60°C. As membranas apresentam-se com espessura 60,0±0,25 µm, mas as características visuais das membranas variam de acordo com o método de reticulação utilizado.

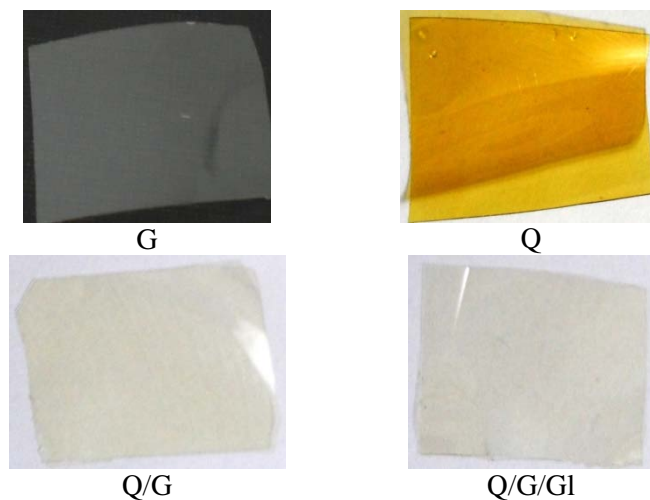


Figura 6: Membranas de gelatina (G), quitosana (Q) e da mistura na proporção 1:1 (v/v), contendo (Q/G/Gl) ou não glicerina (Q/G)

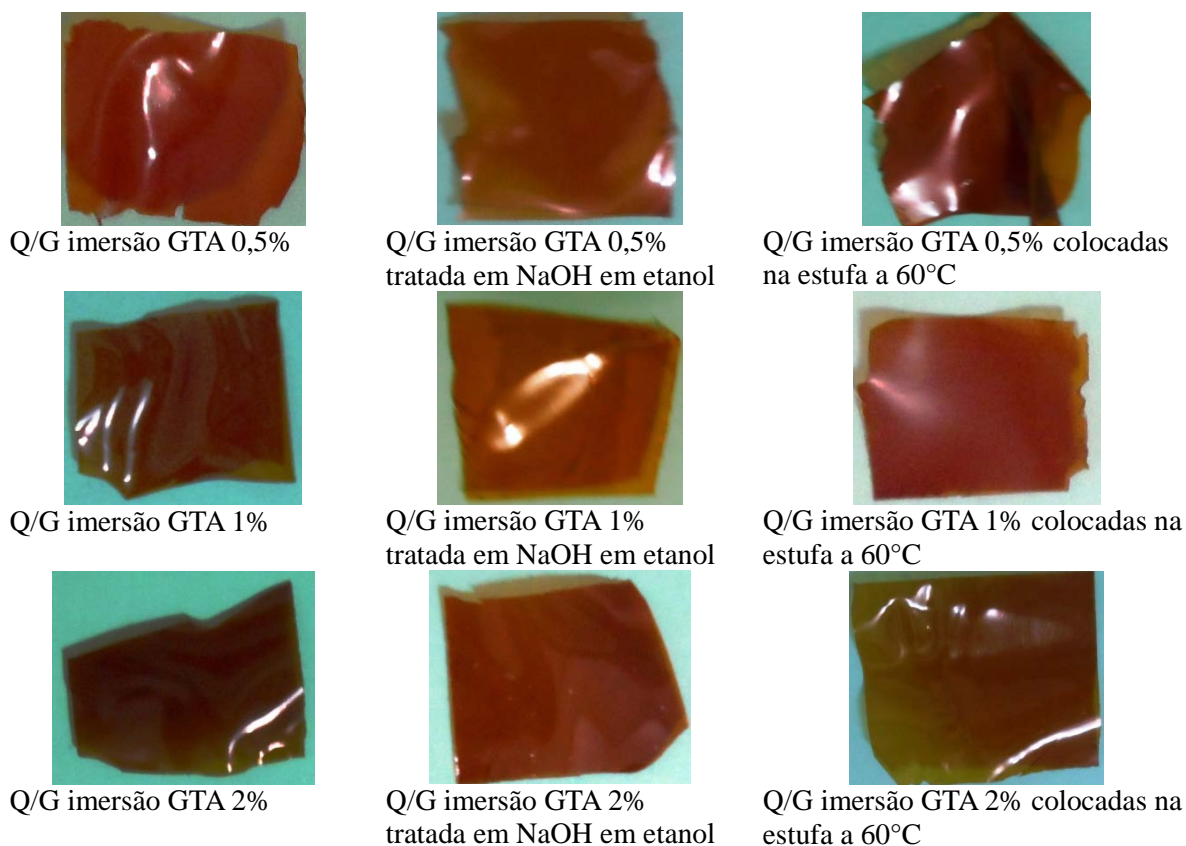


Figura 7: Membranas de quitosana/gelatina reticuladas com 0,5%, 1% e 2% de glutaraldeído pelo método imersão sem neutralização e neutralizadas em: solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em etanol 99% ou mantidas em estufa a 60°C.

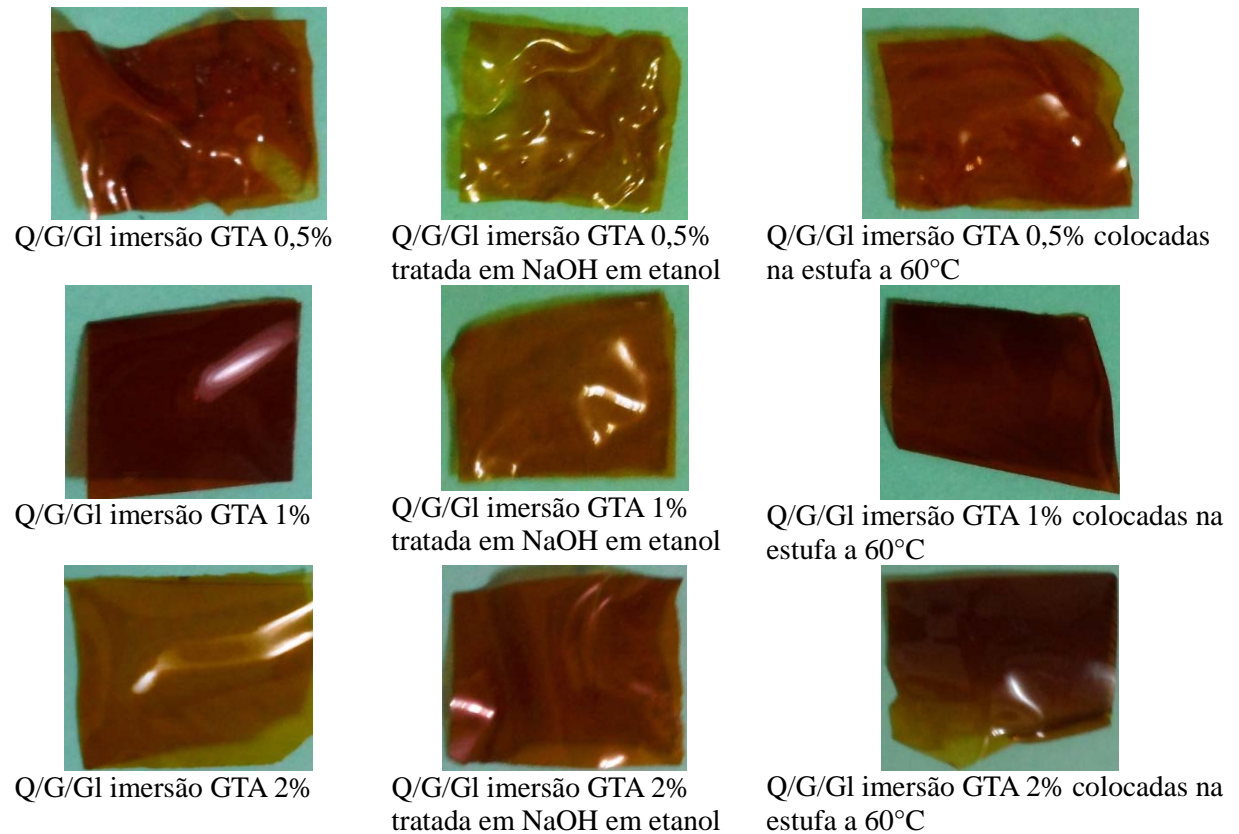


Figura 8: Membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas com 0,5%, 1% e 2% de glutaraldeído pelo método imersão sem neutralização e neutralizadas em: solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em etanol 99% ou mantidas em estufa a 60°C.

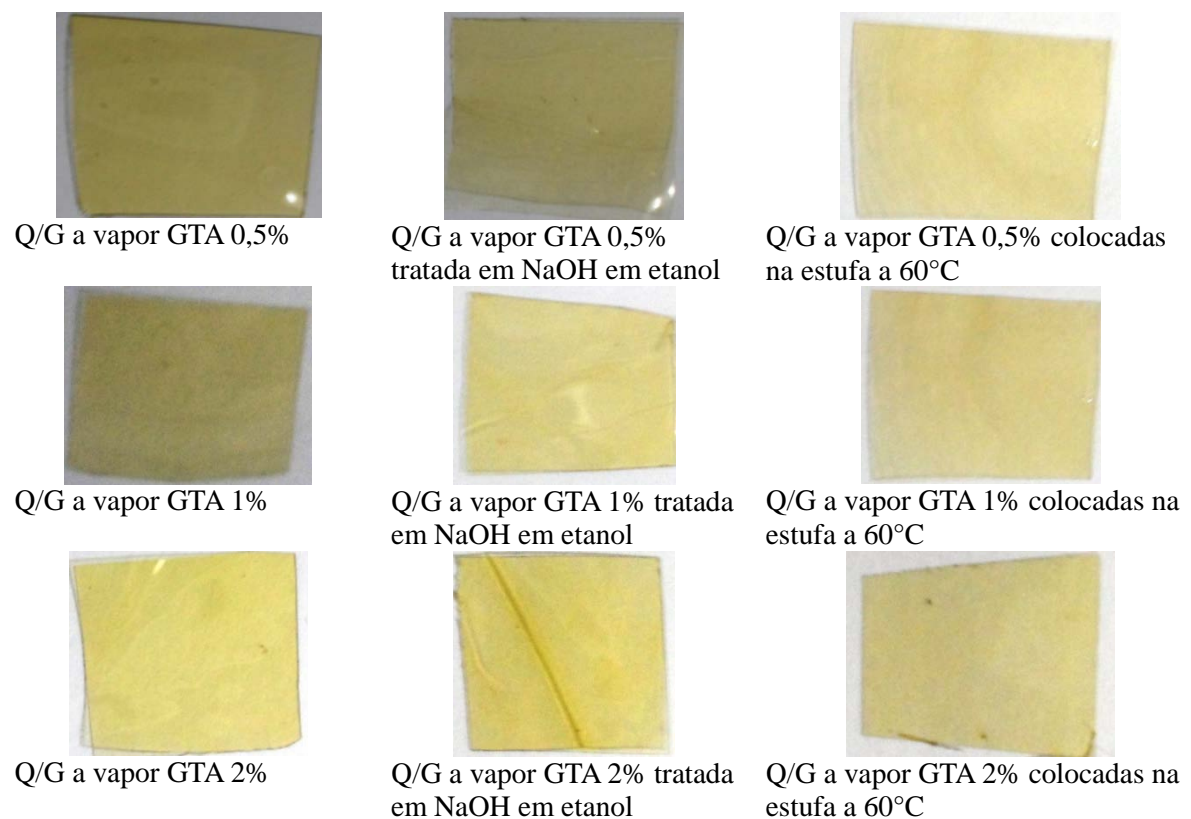


Figura 9: Membranas de quitosana/gelatina reticuladas com 0,5%, 1% e 2% de glutaraldeído pelo método de vapor sem neutralização e neutralizadas em: solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em etanol 99% ou mantidas em estufa a 60°C.

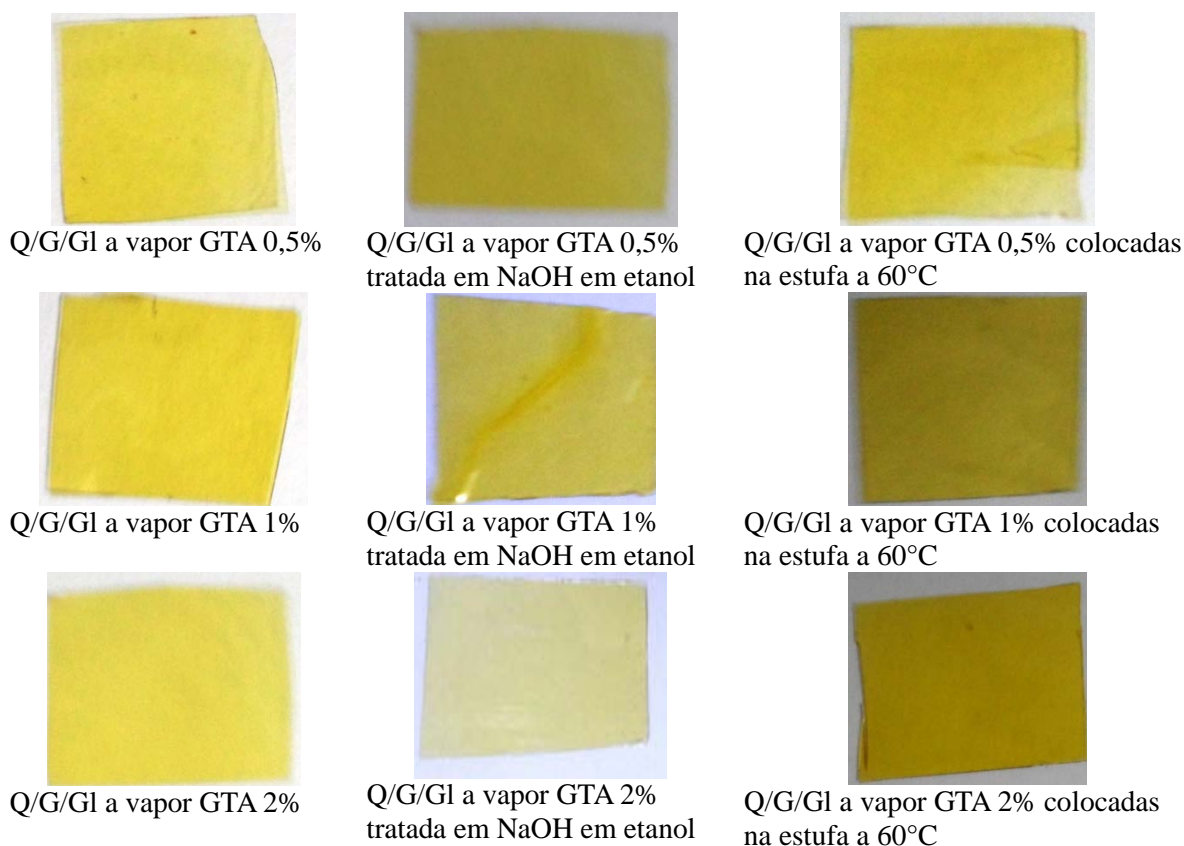


Figura 10: Membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas com 0,5%, 1% e 2% de glutaraldeído pelo método de vapor sem neutralização e neutralizadas em: solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou mantidas em estufa a 60°C.

A Tabela 1 apresenta a avaliação qualitativa das características observadas nas membranas, no que diz respeito à coloração, flexibilidade e aspecto visual. Deste modo, foi observado que o método por imersão em solução de GTA promove maior rigidez às membranas, deixando-as quebradiças e de difícil manipulação e as tornam marrons. Resultados semelhantes são encontrados na literatura, os quais mostram que o glutaraldeído torna os filmes de quitosana mais quebradiços, devido à diminuição da mobilidade das cadeias poliméricas e com cores mais escuras, provavelmente relacionada à presença do grupo C=N (COSTA JÚNIOR, 2008).

As membranas reticuladas a vapor conservaram a cor amarelada, porém com um tom mais escuro do que antes de serem reticuladas, e não ficaram quebradiças. Além disso, as membranas reticuladas por esse método e que continham glicerina foram flexíveis e de fácil manipulação. Estudos mostraram que membranas de gelatina reticuladas por glutaraldeído através do método de adição apresentaram-se amareladas, característicos da base de *Schiff* (MARTUCCI, RUSECKAITE e VAZQUEZ, 2006). Isso pode dar indício que a metodologia a vapor pode ter sido eficaz para a obtenção de membranas reticuladas por vapor de

glutaraldeído. Até a presente data não há trabalhos na literatura que empregam o método a vapor.

Tabela 1: Avaliação qualitativa das membranas

| Membranas | Observações |
|---|----------------------------|
| G | Transparente, rígida |
| Q | Amarela, rígida |
| Q/G | Amarelo claro, rígida |
| Q/G/GI | Amarelo claro, flexível |
| Q/G reticulada por imersão | Marrom, rígida, quebradiça |
| Q/G reticulada por imersão e tratadas com NaOH em etanol | Marrom, rígida, quebradiça |
| Q/G reticulada por imersão e colocadas na estufa | Marrom, rígida, quebradiça |
| Q/G/GI reticulada por imersão | Marrom, rígida |
| Q/G/GI reticulada por imersão e tratadas com NaOH em etanol | Marrom, rígida |
| Q/G/GI reticulada por imersão e colocadas na estufa | Marrom, rígida |
| Q/G reticulada a vapor | Amarelo escuro, rígida |
| Q/G reticulada a vapor e tratadas com NaOH em etanol | Amarelo escuro, rígida |
| Q/G reticulada a vapor e colocadas na estufa | Amarelo escuro, rígida |
| Q/G/GI reticulada a vapor | Amarelo escuro, flexível |
| Q/G/GI reticulada a vapor e tratadas com NaOH em etanol | Amarelo escuro, flexível |
| Q/G/GI reticulada a vapor e colocadas na estufa | Amarelo escuro, flexível |

5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

As Figuras de 11 a 14 apresentam os espectros de FTIR das membranas de Q/G e Q/G/GI reticuladas e, posteriormente, tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou mantidas em estufa a 60°C, bem como o espectro da membrana de Q/G não reticulada. Em todas as figuras, o espectro da mistura Q/G é apresentado, a fim de facilitar a comparação entre estes os obtidos das membranas reticuladas. Nos espectros observam-se as bandas características dos polímeros (quitosana e gelatina), conforme descrito no item 5.1. Contudo, na análise pormenorizada destes espectros, observam-se deslocamento da banda em torno de 1654 cm⁻¹, atribuída à ligação imina (C=N) para menores números de onda, sugerindo o efeito do GTA sobre as membranas. O deslocamento da banda referente à ligação C=N está indicado nas figuras através de setas.

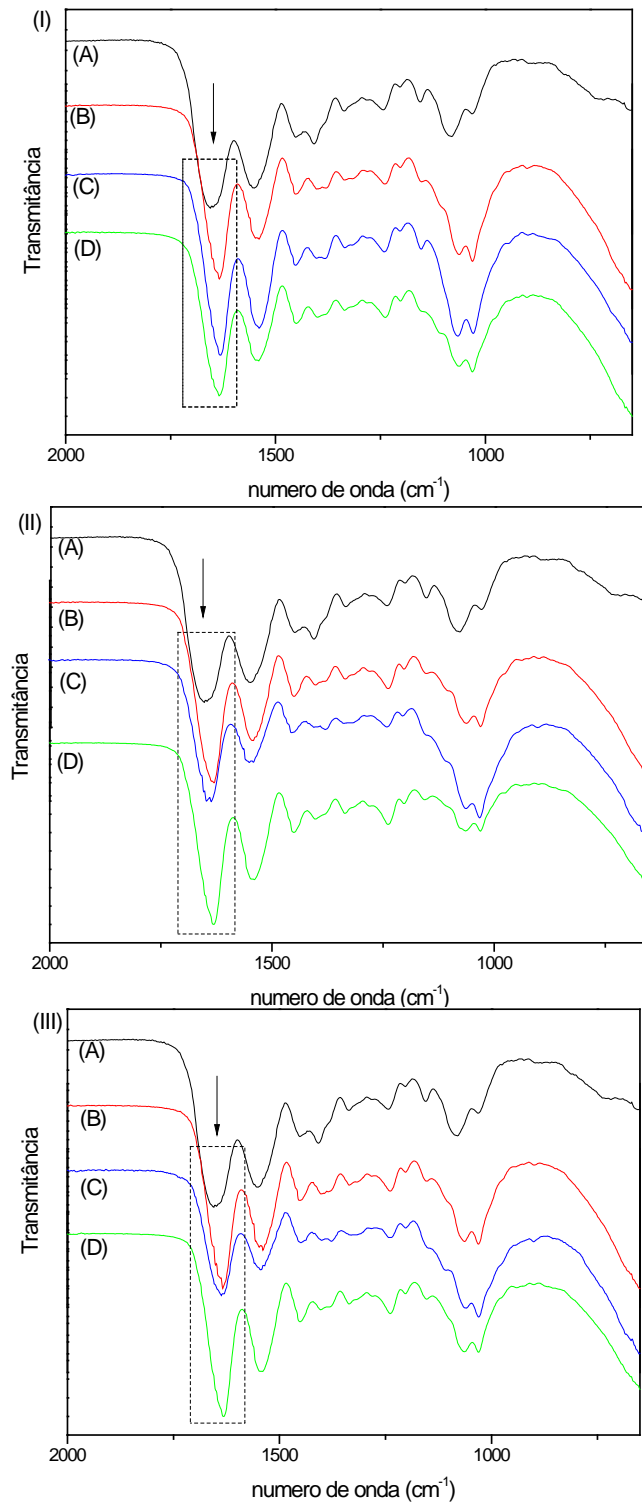


Figura 11: Espectro na região do infravermelho obtidos das membranas de quitosana/gelatina sem reticulação (A) e reticuladas (B) pelo método de imersão com solução de glutaraldeído 0,5% (I) 1% (II) e 2% (III). Os espectros (C) e (D) referem-se, respectivamente, as membranas reticuladas e posteriormente tratadas por imersão em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% e mantidas em estufa a 60°C.

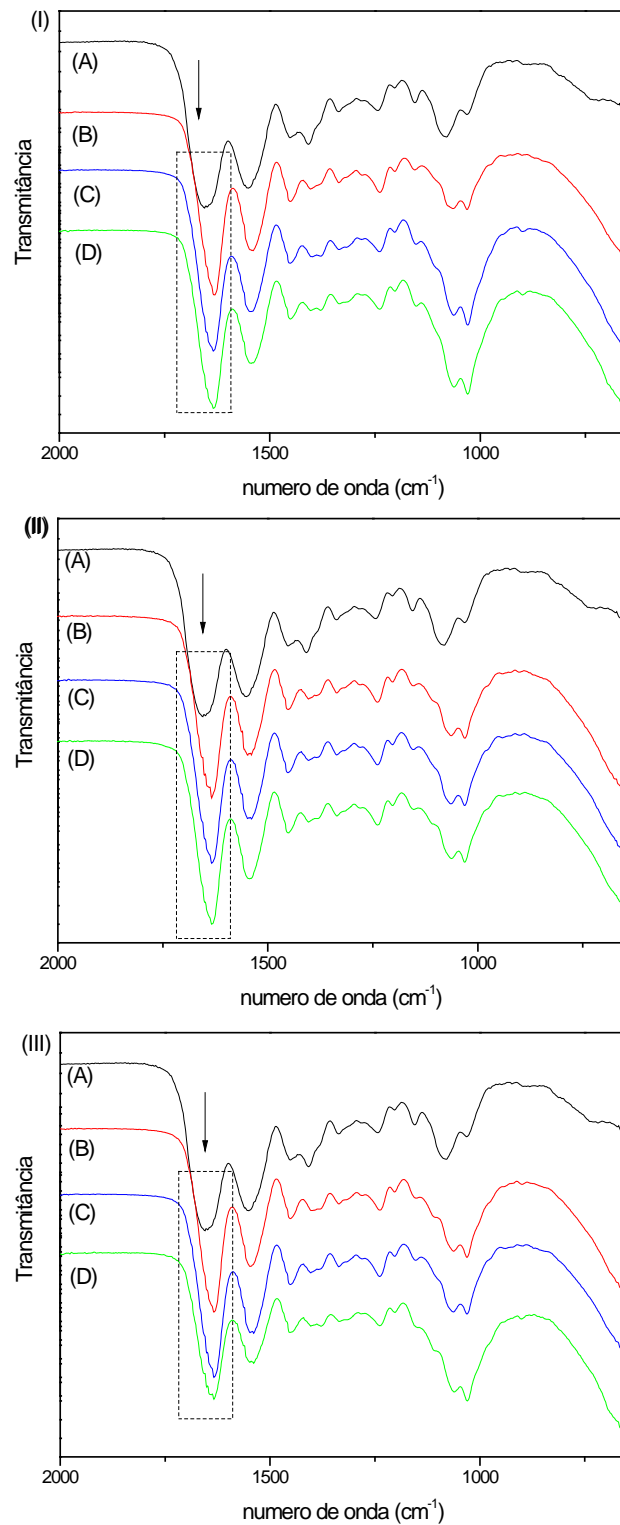


Figura 12: Espectro na região do infravermelho obtidos das membranas de quitosana/gelatina/glicerina sem reticulação (A) e reticuladas (B) pelo método de imersão com solução de glutaraldeído 0,5% (I) 1% (II) e 2% (III). Os espectros (C) e (D) referem-se, respectivamente, as membranas reticuladas e posteriormente tratadas por imersão em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% e mantidas em estufa a 60°C.

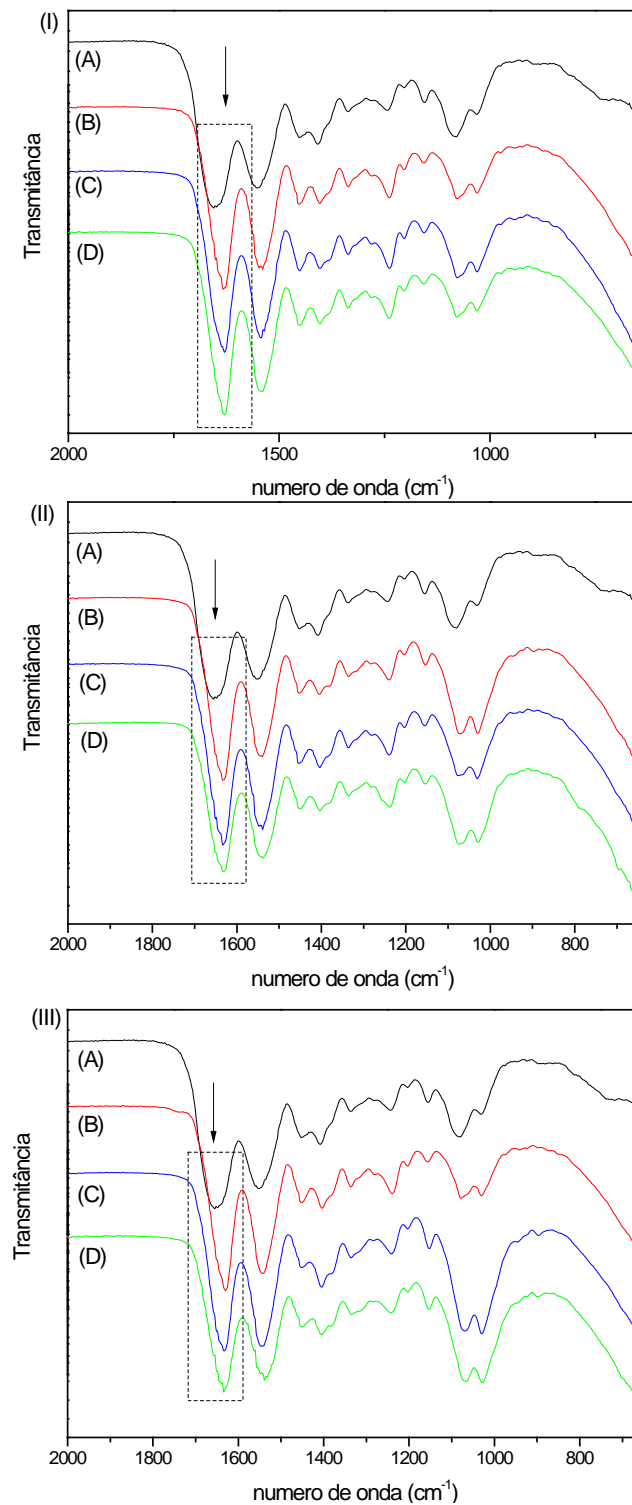


Figura 13: Espectro na região do infravermelho obtidos das membranas de quitosana/gelatina sem reticulação (A) e reticuladas (B) pelo método a vapor com solução de glutaraldeído 0,5% (I) 1% (II) e 2% (III). Os espectros (C) e (D) referem-se, respectivamente, as membranas reticuladas e posteriormente tratadas por imersão em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% e mantidas em estufa a 60°C.

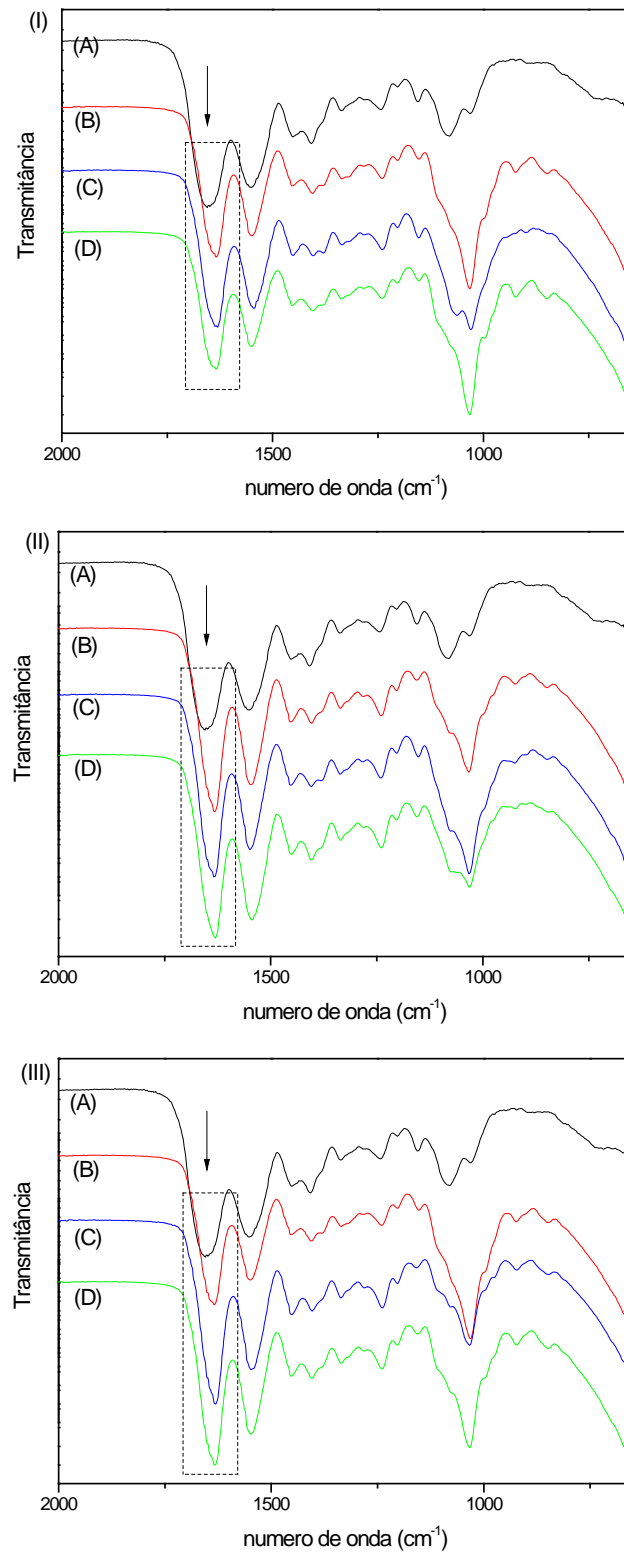


Figura 14: Espectro na região do infravermelho obtidos das membranas de quitosana/gelatina/glicerina sem reticulação (A) e reticuladas (B) pelo método a vapor com solução de glutaraldeído 0,5% (I) 1% (II) e 2% (III). Os espectros (C) e (D) referem-se, respectivamente, as membranas reticuladas e posteriormente tratadas por imersão em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% e mantidas em estufa a 60°C.

A reticulação química das matrizes poliméricas (quitosana e gelatina) com glutaraldeído ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amina ($-NH_2$) que reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água, formando assim a ligação $C=N$ ($\sim 1648\text{ cm}^{-1}$) base de *Schiff* (WANG, 2004; ROKHADE, 2007). Neste método a reticulação é obtida utilizando-se um excesso do agente bifuncional que provera a superfície das matrizes poliméricas com grupos diferentes das aminas iniciais das matrizes, promovendo ligações cruzadas entre o grupo amina e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído (BEPPU, ARRUDA e SANTANA, 1999). No entanto, nos espectros obtidos não foram observadas mudanças significativas nas bandas de frequência com o aumento do teor de glutaraldeído. Assim, a partir dos espectros de FTIR não foi possível determinar se o aumento das contribuições da molécula de glutaraldeído na reação promove o aumento na reticulação da cadeia (Figuras 11 e 12).

Entretanto, cabe ressaltar que o deslocamento da banda referente à imina foi observado nos espectros reticuladas pelo método de imersão (Figuras 11 e 12), bem como a vapor (Figuras 13 e 14). Resultados encontrados na literatura mostram que membranas de colágeno e de quitosana foram eficazmente reticuladas por glutaraldeído quando imersas em soluções desse agente (CHARULATHA e RAJARAM, 2003; BEPPU ARRUDA e SANTANA, 1999). No entanto, até a presente data não há trabalhos na literatura científica que empregam o método de reticulação a vapor, a fim de promover ligações cruzadas em membranas de quitosana e gelatina. Contudo, os resultados obtidos a partir do FTIR indicam que esta metodologia também pode ser empregada a fim de promover reticulação das membranas dos polímeros empregados.

O método de reticulação a vapor baseia-se no princípio do equilíbrio líquido-vapor para sistemas fechados. Neste o líquido tende a entrar naturalmente em equilíbrio termodinâmico com o seu vapor. Esse equilíbrio termodinâmico está relacionado com o movimento relativo das moléculas em relação à interface que divide a fase líquida e a fase vapor. No estado gasoso as moléculas se movimentam independentemente e, quando isoladas em uma câmara a vapor se movimentam de forma aleatória. Esta metodologia é empregada para deposição de filmes finos em, por exemplo, processos de microeletrônica, no qual os filmes são formados pela condensação de átomos ou moléculas de um vapor sobre um substrato (TATSH, 1998). Deste modo, quando submetido a vapor as moléculas do estado de vapor do glutaraldeído se movimentem de forma aleatória no sistema fechado e as membranas da matriz polimérica se comportam como um substrato para a aderência do reticulante condensado.

Assim, na metodologia a vapor, a reticulação ocorre provavelmente pelo vapor de glutaraldeído, o qual ao entrar em contato com as membranas condensa, pode formar camadas do agente reticulante na superfície da membrana. Esse é um processo lento, no qual a intensidade do processo de formação de ligação cruzada foi gradual, cuja expectativa foi de introduzir ligações de reticulações mais homogêneas. Isso pode ter sido obtido uma vez que as membranas reticuladas por este método não se apresentaram quebradiças (ver Tabela 1), e a formação de trincas pode estar associada a regiões que foram parcial ou totalmente não reticuladas (GOISSIS et al, 1998). As trincas que formam devido à fragmentação podem funcionar como sítios primários de calcificação (GOISSIS et al, 1998; LEE, 1994). Em contraste, na metodologia de imersão o processo de reticulação é rápido e ocorre através do contato direto da membrana com a solução de glutaraldeído, obtendo-se membranas facilmente quebradiças.

5.3 Ensaio de Intumescimento

A habilidade de absorção e retenção de água é um fator importante para materiais implantáveis, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de metabolitos e nutriente. No entanto, a elevada taxa de absorção de água trás consequências indesejáveis como a redução da estabilidade estrutural do polímero, além da aceleração da degradação e de ataque de microrganismos (THEIN-HAN e KITTYANANT, 2007)

O grau de intumescimento depende da interação polímero-solvente e do grau de reticulação do polímero (MEI et al, 1995). A proporção de ligações cruzadas é um dos fatores mais importantes que afetam o intumescimento dos polímeros (PEPPAS, 2000). Assim, com o intuito de aumentar a resistência das membranas à degradação em condições fisiológicas, foi promovida sua reticulação pelo agente glutaraldeído pelos métodos de imersão e a vapor, anteriormente descritos. A partir dos valores calculados das porcentagens de intumescimento, foram obtidos os gráficos apresentados nas Figuras de 15 a 28.

5.3.1 Membranas quitosana e gelatina

A Figura 15 apresenta os gráficos da taxa de intumescimento das membranas de quitosana e gelatina, onde foi possível observar que a gelatina atingiu o equilíbrio de intumescimento em 15 minutos e se manteve constante por um período de 24h. Após esse período, observou-se que essas membranas degradaram, não sendo possível continuar o ensaio. Esse resultado confirma o alto grau de hidrofiliicidade da gelatina, mostrando que esta se dissolve em meio aquoso (ALVES, 2005; WOLF, 2007). Para a quitosana, após 15 minutos de ensaio de intumescimento as membranas já sofrem o processo de degradação. Os filmes de quitosana apresentam, na condição seca, baixa permeação de gases e apresentam alta afinidade com a água. Isso é devido à predominância dos grupos amino da quitosana, caracterizados por ligações covalentes (N-H), onde a eletronegatividade dessas ligações gera sítios de alta polaridade, torna-se favorável o rearranjo de moléculas de água ao seu redor. Essa característica associada aos grupos acetamida, que também são polares, caracteriza essa macromolécula como um material com alto grau de hidrofiliicidade. Essa afinidade por água traz consequências indesejáveis como a redução da estabilidade natural do polímero, a presença de unidade, que provoca a desagregação das fibras (ASSIS e SILVA, 2003). Assim, os resultados dos ensaios de intumescimento dos polímeros puros sugerem que o uso dessas membranas como material para RTG não é adequado quando empregado puros e sem a presença de aditivos. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura que mostram que filmes puros de quitosana e gelatina têm aplicação limitada na RTG por apresentarem alta afinidade com a água (KIM et al, 2005)

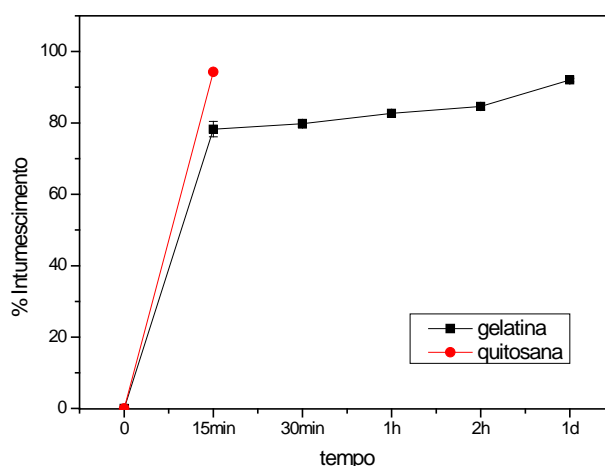


Figura 15: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana e de gelatina.

Nos gráficos de intumescimento das membranas de Q/G observa-se que estas tiveram baixo tempo de durabilidade (dois dias) e as de Q/G/Gl iniciaram um processo de perda de massa em sete dias de experimento (Figura 16). Na comparação dos resultados obtidos para as membranas puros e para a mistura, verifica-se que a mistura confere maior estabilidade as membranas frente à degradação e que a glicerina aumentou a durabilidade das membranas de quitosana e gelatina para trinta dias. Artigos encontrados na literatura também mostram que filmes da mistura quitosana e gelatina são mais estáveis do que os filmes dos polímeros puros em soluções de pH 7 (KIM et al, 2005). Isso indica que as membranas obtidas a partir da mistura podem apresentar melhores características para uso em RTG. No entanto, verifica-se que a estabilidade e durabilidade dessas membranas em solução aquosa são baixas, o que limita seu uso e aplicações. Neste sentido, o emprego de um método de reticulação pode melhorar suas estabilidades mecânicas e estruturais (BERGER et al, 2004; NIMNI, 2001).

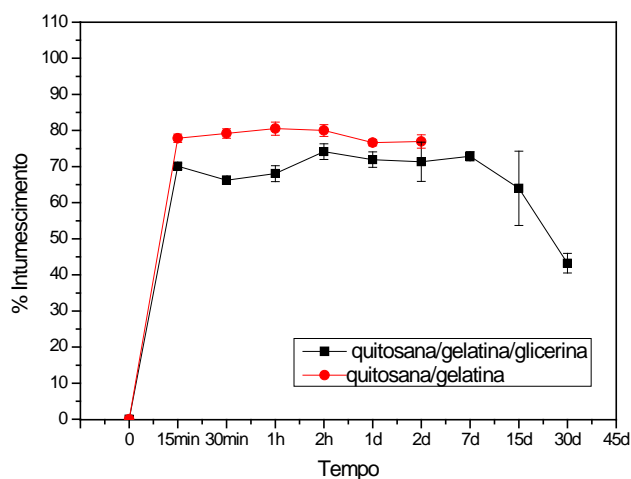


Figura 16: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/glicerina.

5.3.2 Membranas reticuladas por imersão

5.3.2.1 Membranas quitosana/gelatina

Os gráficos com a porcentagem de intumescimento em função do tempo para amostras das membranas de Q/G reticuladas por imersão em soluções de glutaraldeído (0,5, 1, 2%

volume/volume) são mostrados nas Figuras de 17 a 19

Nestas figuras, observa-se um rápido intumescimento para os primeiros quinze minutos seguidos de um aumento de absorção de massa (solvente) em função do tempo. Para as membranas reticuladas com glutaraldeído 0,5% (Figura 17), verifica-se maior taxa de intumescimento em função do tempo para as membranas reticuladas e tratadas com solução de NaOH em etanol ou colocadas na estufa a 60°C (~ 70 e 60% respectivamente), quando comparadas as membranas apenas reticuladas (~50%). Isso indica que estes tratamentos podem influenciar no processo de reticulação e absorção de solvente destas membranas. He e colaboradores, 2011, estudaram o efeito de diferentes soluções de neutralização em filmes de quitosana e verificaram que a natureza das soluções de neutralização pode afetar propriedades físico-químicas dos filmes de quitosana. Resultados encontrados na literatura indicam que entre os fatores que afetam o intumescimento incluem-se o pH, a força iônica, a temperatura e o grau de reticulação (PEPPAS et al, 2000). Contudo, estudos indicam que a neutralização é um passo importante para o emprego de matrizes de quitosana na engenharia de tecido (AMARAL et al, 2009; He et al, 2011; ZHENG et al, 2009).

No entanto, para as membranas reticuladas com solução 1% (Figura 18) observa-se uma diminuição na variação das taxas de intumescimento das membranas neutralizadas após reticulação com relação as que não foram neutralizadas. Para as membranas reticuladas com solução 2% (Figura 19) essa variação foi ainda menor, de modo que não foi observada variação significativa na taxa de intumescimento para as membranas neutralizadas com solução de NaOH em etanol ou colocadas em estufa a 60°C, quando comparadas com as apenas reticuladas. Isso sugere que o aumento da concentração do agente reticulante diminui a contribuição da neutralização (força iônica e temperatura) ao processo de absorção de massa (intumescimento) das membranas de Q/G. Ademais, observa-se menor taxa de intumescimento em função do tempo para as membranas de quitosana/gelatina reticuladas com glutaraldeído 2% (Figura 19), com relação as que foram tratadas com solução 0,5 e 1% (Figuras 17 e 18), sugerindo que aumento da concentração de glutaraldeído pode promover o aumento na reticulação das membranas. Resultados encontrados na literatura indicam que maiores concentrações de reticulante aumenta o grau de reticulação de membranas de quitosana (SILVA et al, 2004).

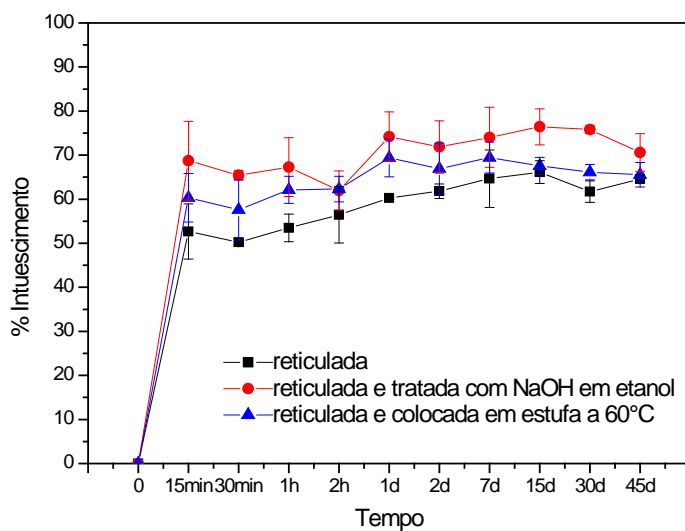


Figura 17: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina reticuladas por imersão em solução de glutaraldeído 0,5% v/v por 30 minutos tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

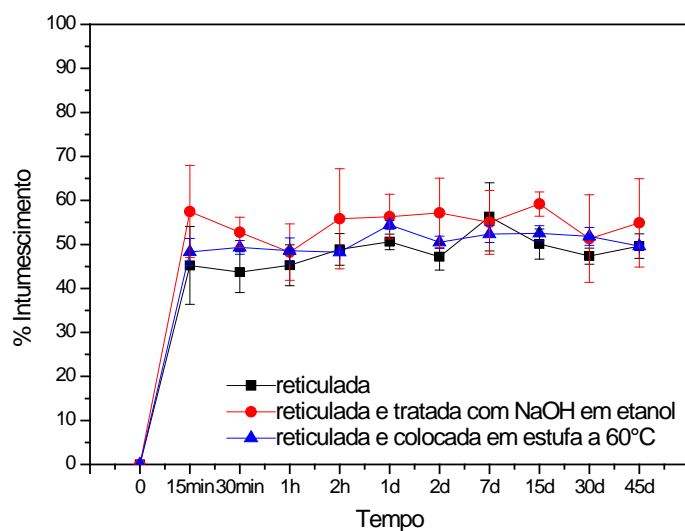


Figura 18: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina reticuladas por imersão em solução de glutaraldeído 1% v/v por 30 minutos tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

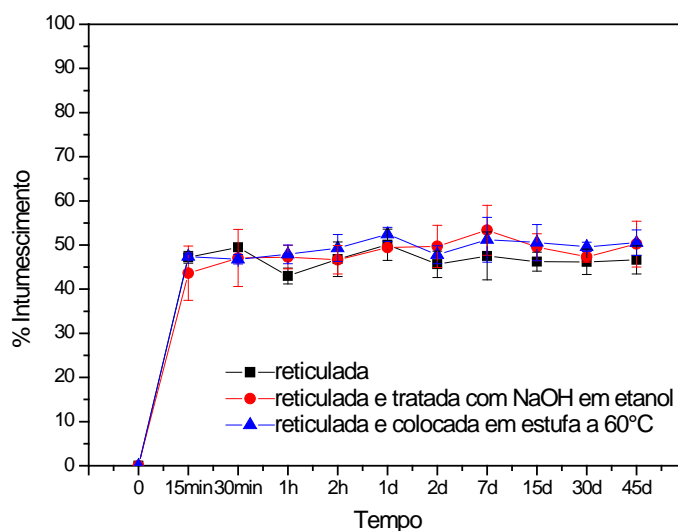


Figura 19: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina reticuladas por imersão em solução de glutaraldeído 2% v/v por 30 minutos tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

5.3.2.2 Membranas quitosana/gelatina/glicerina

Os gráficos com a porcentagem de intumescimento em função do tempo para amostras das membranas de Q/G/Gl reticuladas por imersão em soluções de glutaraldeído (0,5, 1% e 2% v/v) são mostrados nas Figuras 20 a 22.

Para as amostras das membranas de Q/G/Gl reticuladas por imersão com soluções de glutaraldeído observa-se que todas sofrem um rápido intumescimento para os primeiros quinze minutos seguidos de uma tendência de estabilização. Isto sugere que o processo de absorção destas amostras pode ter atingido equilíbrio. Na análise dos gráficos das taxas de intumescimento com relação ao aumento da concentração do agente reticulante observa-se que o intumescimento das membranas de Q/G/Gl reticuladas com glutaraldeído 2% (Figura 22) apresentam menores taxas do que as que foram tratadas com solução de glutaraldeído 0,5 e 1% (ver Figuras 20 e 21). Estes resultados estão em concordância com os obtidos para as membranas de quitosana/gelatina que indicam que o grau de reticulação das membranas aumentou com o aumento da concentração de glutaraldeído.

Além disso, para as membranas contendo glicerina observa-se que a etapa de neutralização (imersão em solução de NaOH em etanol ou colocadas em estufa a 60°C) não interferiu significativamente no processo de absorção de massa, em contraste ao resultado obtido para a membrana de Q/G imergida em glutaraldeído 0,5%. Na comparação com os resultados obtidos para as membranas de Q/G e Q/G/Gl observa-se que a taxa de

intumescimento foi maior para as membranas contendo glicerina e reticuladas com solução 0,5% (Figuras 17 e 20, respectivamente). Isso pode ter sido devido ao efeito do plastificante, o qual pode diminuir as forças coesivas afastando as cadeias poliméricas e aumentar o caráter hidrofílico das membranas (BIERHALZ e KIECKBUSCH, 2009). No entanto, para as membranas reticuladas com solução 1% e 2% (Figuras 21 e 22, respectivamente), a absorção de massa para as membranas contendo glicerina foi em torno de 50%, resultado semelhante ao obtido para as membranas sem glicerina (Figuras 17 e 18), sugerindo que o efeito higroscópico do plastificante pode não ter sido significativo quando as membranas foram reticuladas com soluções de glutaraldeído de maiores concentrações.

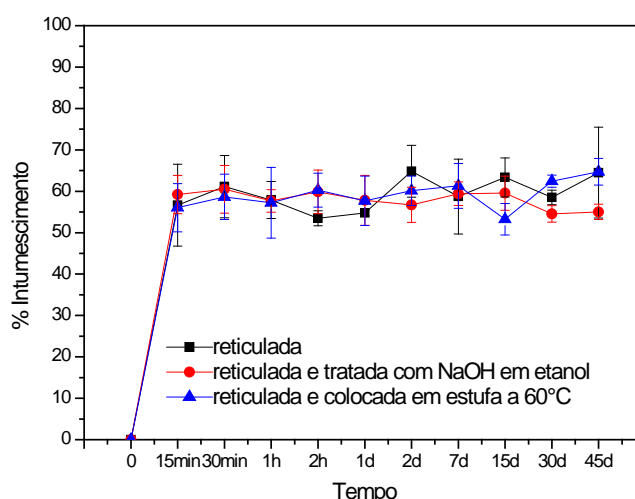


Figura 20: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por imersão em solução de glutaraldeído 0,5% v/v por 30 minutos tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

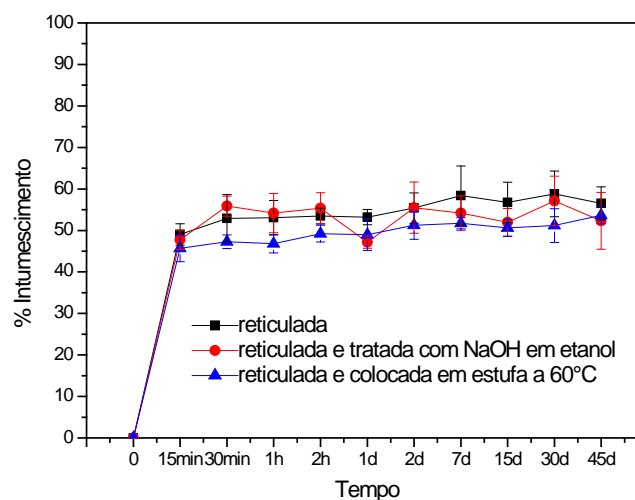


Figura 21: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por imersão em solução de glutaraldeído 1% v/v por 30 minutos tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

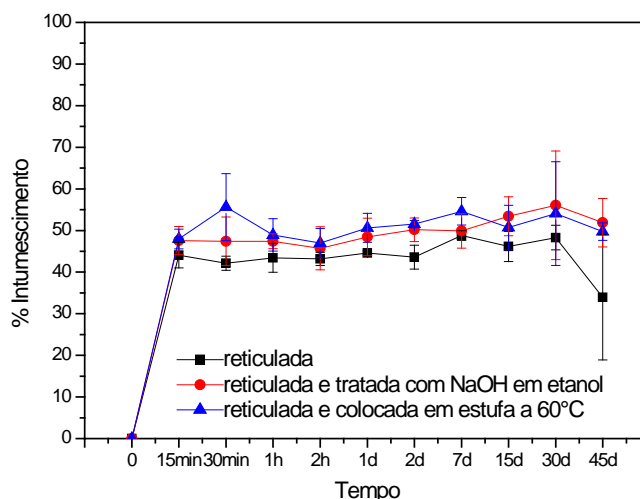


Figura 22: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por imersão em solução de glutaraldeído 2% v/v por 30 minutos tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

5.3.3 Membranas reticuladas por vapor

5.3.3.1 Membranas quitosana/gelatina

As Figuras de 23 a 25 apresentam os gráficos com a porcentagem de intumescimento em função do tempo para amostras das membranas de Q/G que foram reticuladas pelo método a vapor com soluções de glutaraldeído 0,5, 1 e 2% (volume/volume). Nos gráficos observa-se que estas apresentaram tendência a estabilidade de absorção de massa após 15 minutos, sugerindo equilíbrio na absorção do solvente.

Para as membranas reticulas com glutaraldeído 0,5% e neutralizadas com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99%, observa-se menor taxa de intumescimento em função do tempo, com relação as que foram somente reticuladas, reticuladas e neutralizadas a 60°C (Figura 23). A partir de sete dias de ensaio, verificou-se um declínio na taxa de intumescimento, que pode indicar um processo de perda de massa nas membranas. Nos ensaios de intumescimento das membranas de Q/G reticuladas por vapor com soluções glutaraldeído 1% neutralizadas ou não com solução de NaOH em etanol ou a 60°C (Figura 24) observa-se valores de intumescimento semelhantes para todas as membranas. Para um dia de experimento, observa-se um processo de perda de massa nas membranas, que é mais acentuado para as reticuladas e neutralizadas com solução de NaOH em etanol. No entanto,

para as membranas somente reticuladas, reticuladas e neutralizadas a 60°C, a partir de dois dias observa-se que estas se encontram fragmentadas, ocorrendo, possivelmente, um processo de degradação, não sendo assim possível continuar os ensaios de intumescimento. A Figura 25 apresenta os ensaios de intumescimento das membranas de Q/G reticuladas por vapor com soluções de glutaraldeído 2%, observa-se que nesta concentração de agente reticulante as neutralizações contribuíram para maiores valores na taxa de intumescimento. Assim, verificou-se menor intumescimento em função do tempo para as membranas apenas reticuladas. Além disso, para estas membranas, também foi observado um processo de perda de massa, que iniciou em sete dias de ensaio, de modo que em 15 dias o experimento foi interrompido para as membranas reticuladas e neutralizadas a 60°C e em 30 dias para as somente reticuladas, reticuladas e neutralizadas com solução de NaOH em etanol.

Na comparação dos resultados obtidos para as membranas reticuladas pelo método por vapor, verifica-se que o aumento da concentração de agente reticulante diminui a taxa de intumescimento, em concordância aos resultados obtidos pelo método de reticulação por imersão. No entanto, as membranas reticuladas pelo método por vapor, em maiores concentrações de glutaraldeído (1% e 2%) apresentam perda de massa, que inicia em torno de sete dias e torna-se completo em 30 dias (para as reticuladas com glutaraldeído 2%). Isso indica que a durabilidade dessas membranas é menor, quando comparadas às membranas reticuladas pelo método de imersão, as quais não apresentam perda de massa total em até 45 dias de experimento (ver Figuras 17 a 22).

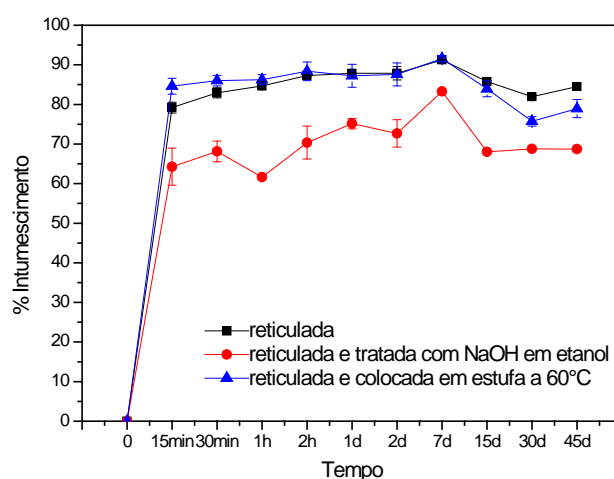


Figura 23: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído 0,5% v/v por 24 horas tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C

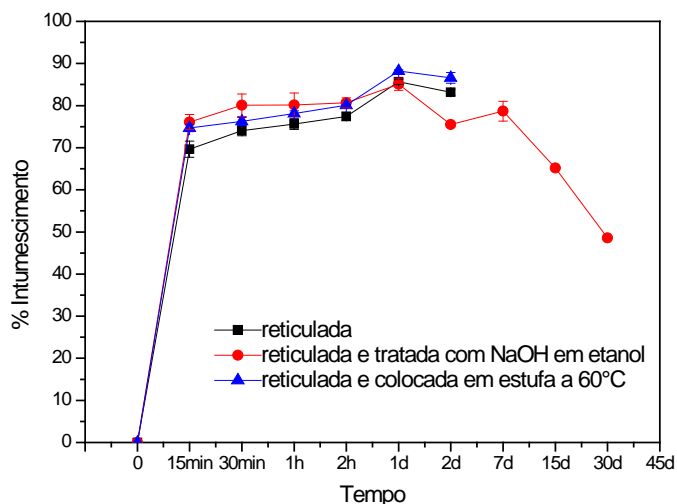


Figura 24: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído 1% v/v por 24 horas tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa

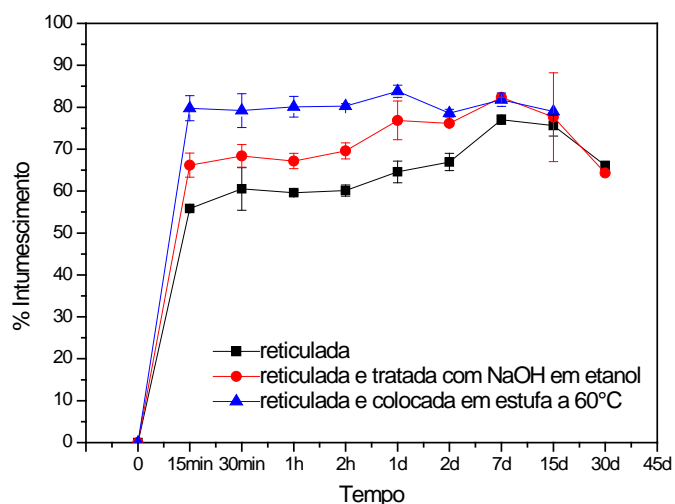


Figura 25 Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído 2% volume/volume por 24 horas tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa

5.3.3.2 Membrana quitosana/gelatina/glicerina

As Figuras 26 a 28 apresentam os gráficos com a porcentagem de intumescimento em função do tempo para amostras das membranas de Q/G/Gl que foram reticuladas pelo método

por vapor com soluções de glutaraldeído 0,5, 1 e 2% (v/v).

Na Figura 26 observam-se os resultados dos ensaios de intumescimento obtido para as membranas de Q/G/GI reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído a 0,5%. Nestas verifica-se que, em todos os tratamentos, a taxa de absorção de solvente atingiu estabilidade em um período superior a 15 minutos. No entanto, de 1 a 7 dias de ensaio, observa-se aumento na absorção de massa, o qual decresce após esse período. O mesmo perfil de intumescimento é obtido para as membranas reticuladas com glutaraldeído 1% (Figura 27); no entanto este processo ocorre de 2 a 7 dias. Para as membranas reticuladas com solução 2% (Figura 28), também é observada um aumento na taxa de intumescimento no período de 1 a 7 dias e, este processo de absorção de massa é mais acentuado para as membranas somente reticuladas e reticuladas e colocadas na estufa. Após sete dias, observa-se novamente uma tendência de estabilização de absorção massa.

Ao comparar os resultados obtidos para as membranas contendo glicerina e reticuladas pelo método por vapor, observa-se que o aumento da concentração do reticulante também diminui a taxa de intumescimento em função do tempo. Além disso, verifica-se, em contraste ao obtido para as membranas sem glicerina, não apresentam perda de massa total em até 45 dias de experimento. Isso indica que a glicerina pode ter conferido maior estabilidade frente à perda de massa e a degradação às membranas reticuladas pelo método por vapor.

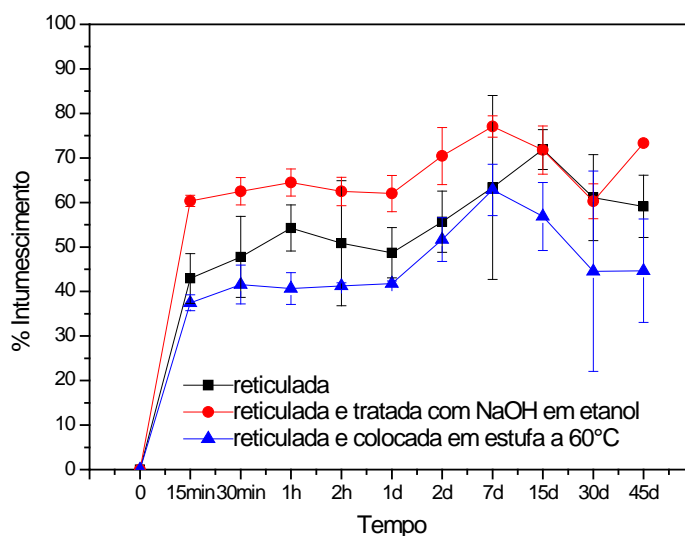


Figura 26: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído 0,5% v/v por 24 horas tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

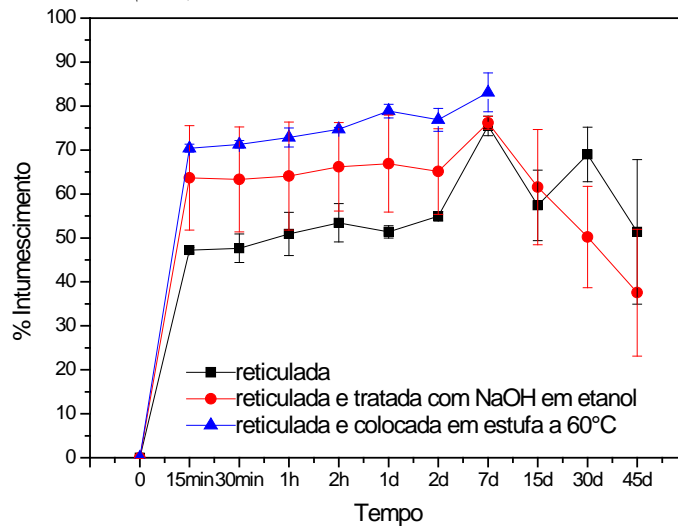


Figura 27: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído 1% v/v por 24 horas tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

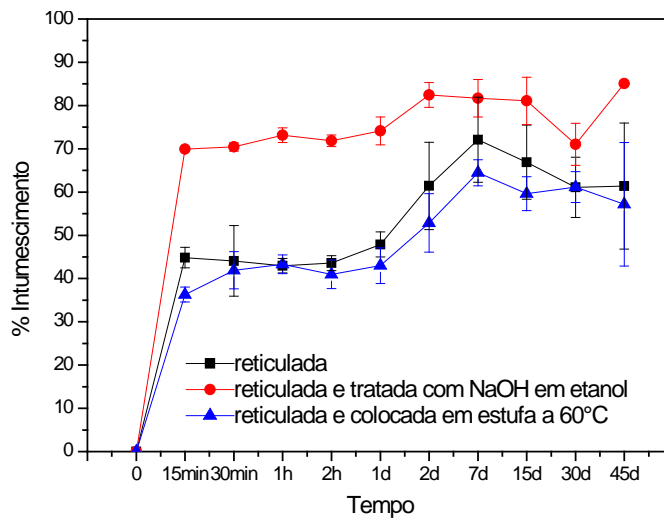


Figura 28: Gráfico da taxa de intumescimento das membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas a vapor com solução de glutaraldeído 2% v/v por 24 horas tratadas ou não com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ em etanol 99% ou colocadas em estufa a 60°C.

5.4 Análise do comportamento de intumescimento das membranas

Na Figura 29 é apresentado o gráfico contendo a curva de $\ln P$ vs $\ln t$ utilizada para obtenção do expoente difusional χ e da constante de difusão (k) para a membrana de quitosana/gelatina reticulada por imersão em solução de glutaraldeído 1% e, da mesma forma,

curvas análogas foram obtidas para as demais membranas. A partir de cada curva de $\ln P$ vs $\ln t$ foi possível obter os valores de η e de k .

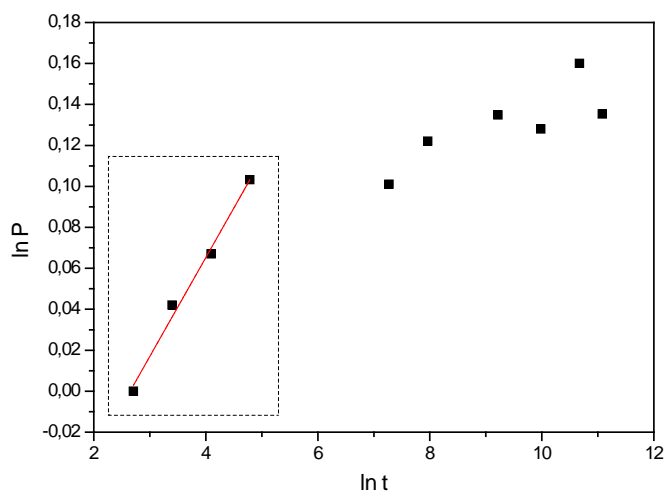


Figura 29: Curva de $\ln P$ vs $\ln t$ a partir da qual foram obtidos os valores do expoente difusional e da constante de difusão para as membranas de quitosana/gelatina reticulada por imersão em solução de glutaraldeído 1% v/v.

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os valores de η e k para as membranas de Q/G e Q/G/GI reticuladas pelos métodos de imersão e por vapor, respectivamente. Nestas tabelas também são apresentados os resultados para as membranas reticuladas e posteriormente neutralizadas ou não com solução de NaOH em etanol ou a 60°C.

Ao se analisar os valores obtidos para o expoente difusional, melhores dispostos na Figura 30, perceber-se que, para as membranas apenas reticulada, contendo ou não glicerina, o aumento da concentração de glutaraldeído provoca a diminuição dos valores de η . Embora essa diminuição seja mais significativa na reticulação por imersão, esse decréscimo também é observado quando empregado o método por vapor. Esses resultados estão em concordância com os observados nos ensaios de intumescimento, os quais mostram menores taxas de intumescimento ao se empregar maiores concentrações de glutaraldeído e que essas taxas são menores para as membranas reticuladas por imersão. Assim, pode-se inferir que o parâmetro η é diretamente proporcional ao grau de intumescimento das membranas e, portanto, também a reticulação. Resultados encontrados na literatura também sugerem que para filmes com mais altos valores de grau de intumescimento, maiores valores de η são obtidos (AOUADA et al, 2009).

Tabela 2: Parâmetros obtidos do intumescimento das diferentes membranas de quitosana e gelatina reticuladas pelo método de imersão.

| Membranas | η | k (s ⁻¹) |
|---|--------|------------------------|
| Q/G imersão 0,5% não neutralizada | 0,047 | 0,756 |
| Q/G imersão 0,5% neutralizada em NaOH e etanol | 0,021 | 0,887 |
| Q/G imersão 0,5% neutralizada a 60°C. | 0,048 | 0,718 |
| Q/G imersão 1% não neutralizada | 0,027 | 0,831 |
| Q/G imersão 1% neutralizada em NaOH e etanol | 0,015 | 0,835 |
| Q/G imersão 1% neutralizada a 60°C. | 0,021 | 0,869 |
| Q/G imersão 2% não neutralizada | 0,025 | 0,835 |
| Q/G imersão 2% neutralizada em NaOH e etanol | 0,029 | 0,843 |
| Q/G imersão 2% neutralizada a 60°C. | 0,037 | 0,779 |
| Q/G/Gl imersão 0,5% não neutralizada | 0,053 | 0,771 |
| Q/G/Gl imersão 0,5% neutralizada em NaOH e etanol | 0,041 | 0,787 |
| Q/G/Gl imersão 0,5% neutralizada a 60°C. | 0,043 | 0,763 |
| Q/G/Gl imersão 1% não neutralizada | 0,048 | 0,726 |
| Q/G/Gl imersão 1% neutralizada em NaOH e etanol | 0,024 | 0,861 |
| Q/G/Gl imersão 1% neutralizada a 60°C. | 0,020 | 0,869 |
| Q/G/Gl imersão 2% não neutralizada | 0,019 | 0,835 |
| Q/G/Gl imersão 2% neutralizada em NaOH e etanol | 0,024 | 0,861 |
| Q/G/Gl imersão 2% neutralizada a 60°C. | 0,029 | 0,835 |

Tabela 3: Parâmetros obtidos do intumescimento das diferentes membranas de quitosana e gelatina reticuladas pelo método por vapor.

| Membranas | η | k (s ⁻¹) |
|---|--------|------------------------|
| Q/G a vapor 0,5% não neutralizada | 0,048 | 0,733 |
| Q/G a vapor 0,5% neutralizada em NaOH e etanol | 0,028 | 0,802 |
| Q/G a vapor 0,5% neutralizada a 60°C. | 0,012 | 0,932 |
| Q/G a vapor 1% não neutralizada | 0,045 | 0,756 |
| Q/G a vapor 1% neutralizada em NaOH e etanol | 0,032 | 0,810 |
| Q/G a vapor 1% neutralizada a 60°C. | 0,034 | 0,794 |
| Q/G a vapor 2% não neutralizada | 0,039 | 0,771 |
| Q/G a vapor 2% neutralizada em NaOH e etanol | 0,029 | 0,794 |
| Q/G a vapor 2% neutralizada a 60°C. | 0,020 | 0,861 |
| Q/G/Gl a vapor 0,5% não neutralizada | 0,066 | 0,670 |
| Q/G/Gl a vapor 0,5% neutralizada em NaOH e etanol | 0,038 | 0,787 |
| Q/G/Gl a vapor 0,5% neutralizada a 60°C. | 0,027 | 0,819 |
| Q/G/Gl a vapor 1% não neutralizada | 0,029 | 0,748 |
| Q/G/Gl a vapor 1% neutralizada em NaOH e etanol | 0,029 | 0,819 |
| Q/G/Gl a vapor 1% neutralizada a 60°C. | 0,031 | 0,810 |
| Q/G/Gl a vapor 2% não neutralizada | 0,021 | 0,798 |
| Q/G/Gl a vapor 2% neutralizada em NaOH e etanol | 0,027 | 0,827 |
| Q/G/Gl a vapor 2% neutralizada a 60°C. | 0,024 | 0,873 |

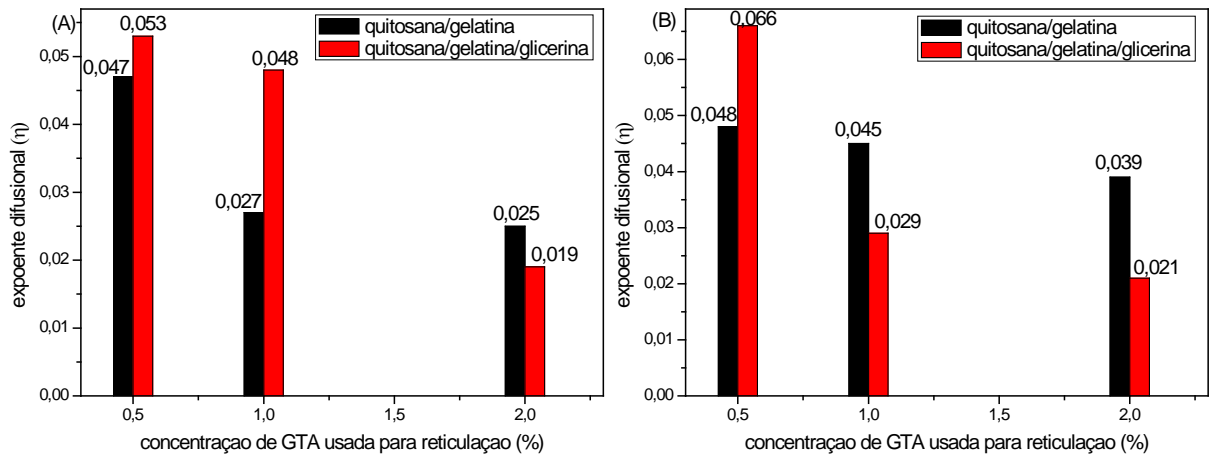


Figura 30: Gráfico comparativos dos valores do expoente difusional obtido para as membranas de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por imersão (A) e vapor (B) com relação às diferentes concentrações de solução de glutaraldeído 0,5, 1 e 2% v/v.

Em contraste, os valores de k seguem tendência contrária aos de n , para as membranas apenas reticuladas (Figura 31). Estes são maiores com o aumento da concentração de glutaraldeído e, uma vez que o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao tempo. Isso indica que, de maneira geral, a difusão do solvente é mais lenta para as membranas tratadas com maiores concentrações de agente reticulante. Esses resultados também corroboram com os obtidos nos ensaios de intumescimento, sugerindo que maiores concentrações de glutaraldeído colaboram para menor absorção de solvente.

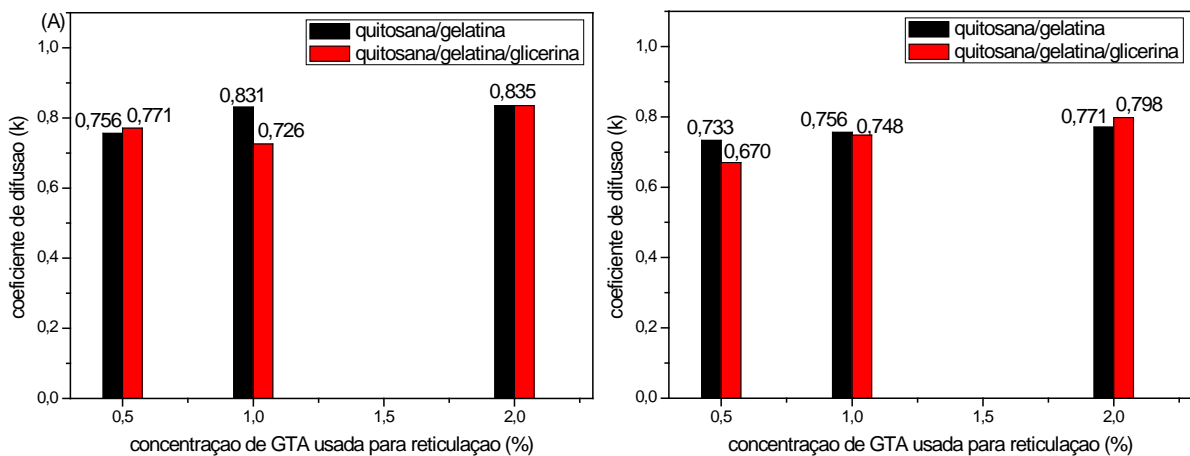


Figura 31: Gráfico comparativos dos valores do coeficiente de difusão obtido para as membranas de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por imersão (A) e vapor (B) com relação às diferentes concentrações de solução de glutaraldeído 0,5, 1 e 2% v/v.

Ademais, observa-se também maiores valores de k para membranas reticuladas por imersão ou por vapor e neutralizadas com solução de NaOH em etanol, sugerindo que este processo também colabora para um processo mais lento da difusão do solvente nas membranas de Q/G contendo ou não glicerina (Tabelas 2 e 3). Estes resultados contrastam com alguns obtidos no ensaio de intumescimento, os quais mostram que membranas de Q/G/Gl reticuladas por vapor, Q/G reticuladas por imersão com solução de glutaraldeído 0,5% e 1% e as reticuladas por vapor com solução 1%, todas neutralizadas com solução de NaOH em etanol, apresentam maior grau de intumescimento, quando comparadas as apenas reticuladas, reticuladas e neutralizadas a 60°C. É importante ressaltar que o k é obtido diretamente pelo coeficiente linear de $\ln P$ vs $\ln t$ (Equação 2), sem levar em conta o mecanismo e a difusão do solvente para o interior da membrana (AOUADA et al, 2009). A formação de ligações cruzadas pelo glutaraldeído obtém-se como resultantes regiões internas da matriz não reticuladas ou parcialmente reticuladas (LEE, 1994). Assim, os resultados obtidos pelo coeficiente de difusão são complementares aos obtidos pelo ensaio de intumescimento, visando melhor elucidar o processo de absorção de massa das membranas.

Além disso, para as membranas de Q/G e Q/G/Gl reticuladas por imersão observa-se menores valores de coeficiente de difusão (k) para as imersas em solução de glutaraldeído 0,5% e neutralizadas a 60°C ($k = 0,718$), comparados aos valores obtidos para as membranas apenas reticuladas ($k = 0,756$). Assim, esses resultados mostram um processo de difusão do solvente mais rápido nas membranas imersas em solução de glutaraldeído a baixa concentração. Resultados encontrados na literatura sugerem que o incremento de temperatura associado a baixas concentrações de glutaraldeído promovem uma maior difusão do reagente na matriz (GOISSIS et al, 1998). Em contraste, para as membranas reticuladas por vapor isso não foi observado. Os valores de k obtidos para as membranas reticuladas por vapor e colocadas na estufa e para as apenas reticuladas são 0,932 e 0,733, respectivamente. Isso indica que para essa metodologia o efeito da temperatura, devido ao processo de neutralização em estufa a 60°C, associado ao glutaraldeído a pequenas concentrações, não corrobora para o incremento da difusão do solvente na matriz polimérica.

Assim, os resultados obtidos nos ensaios de intumescimento e os obtidos mediante os parâmetros associados ao intumescimento sugerem que, de maneira geral, o método de reticulação por imersão fornece maior resistência às membranas frente ao intumescimento e a difusão do solvente. No entanto, sabe-se que a presença de traços residuais de glutaraldeído, que pode não ter sido removido pela lavagem das membranas com água destilada, podem apresentar citotoxicidade para as membranas desenvolvidas (BEPPU et al, 2004; SIMMONS

e KEARNEY, 1993). Apesar dos vários problemas detectados, o glutaraldeído ainda continua sendo o método de reticulação de escolha, na área de biomateriais (YOSHIOKA et al, 1995; AOUADA, 2009). Neste contexto, visto que a metodologia por vapor também apresentou bons resultados nos ensaios de intumescimento e de diminuição do coeficiente de difusão, esta pode apresentar vantagens, em virtude de as membranas terem entrado em contato gradual com o glutaraldeído, a ação citotóxica deste agente pode ser dificultada. Dentre as condições avaliadas, pode-se observar que as membranas contendo glicerina e reticuladas por vapor não aumentaram significativamente as taxas de intumescimento tão pouco os parâmetros cinéticos associados ao intumescimento, além disso, a glicerina conferiu flexibilidade e maior resistência às membranas frente à fragmentação, sugerindo uma condição interessante para a obtenção de membranas para RTG.

6. Conclusões

Foram obtidas membranas de Q/G e Q/G/GI reticuladas por imersão e por vapor com GTA.

A avaliação qualitativa das características físicas mostrou que a reticulação por imersão em GTA deixou as membranas com coloração marrom e mais quebradiças, enquanto que na reticulação por vapor de GTA as membranas ficaram mais amareladas e menos quebradiças. Essa alteração na cor e característica física é um indício do processo de reticulação, confirmado pelos resultados obtidos por FTIR, nos quais foram observados formação de bases de *Schiff*.

Os ensaios de intumescimento para membranas reticuladas tanto pelo método de imersão quanto por vapor em GTA indicaram um aumento na durabilidade dessas membranas, quando comparadas com as membranas sem reticulação. As etapas de neutralização - imersão em solução de NaOH em etanol ou em estufa 60°C - influenciaram nos resultados de intumescimento das membranas, contendo ou não glicerina, em ambos os métodos de reticulação. Além disso, os resultados dos ensaios de intumescimento e a análise dos parâmetros associados ao intumescimento indicaram que o método de reticulação por imersão em GTA, com diferentes concentrações, conferiu as membranas menor grau de intumescimento, quando comparado com os resultados obtidos através da reticulação por vapor de GTA.

Membranas obtidas e reticuladas por vapor em GTA, apesar de apresentarem maiores valores de absorção e difusão de solvente, são mais resistentes a fragmentação, principalmente as que contêm glicerina, as quais apresentaram, também, flexibilidade. Deste modo, estas membranas se mostraram superiores no ponto de vista morfológico, podendo apresentar melhor estabilidade biológica.

Deste modo, a metodologia de reticulação por vapor pode ser uma alternativa no uso do GTA para a formação de ligações cruzadas em matrizes poliméricas e as membranas de quitosana/gelatina/glicerina reticuladas por esse método apresentaram boas características, podendo ser empregadas futuramente em regeneração tecidual guiada. Ademais, uma vez que até a presente data não há trabalhos na literatura científica empregando o método a vapor a fim de obter reticulação de membranas poliméricas, os resultados obtidos podem representar uma contribuição significativa para a ciência.

7. Sugestões para futuros trabalhos

Estudar os parâmetros de intumescimento e avaliar o comportamento da cinética de intumescimento.

Avaliar e comparar o comportamento das membranas utilizando outros agentes reticulantes como o tripolifosfato e a proantocianidina.

Avaliar a biocompatibilidade das membranas mediante ensaios *in vitro*.

Referências¹

- AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUANB, W. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 115, p. 243-249, 2009.
- AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA–PGA implants. **Journal Biomedical Materials Research.**, v.38, p. 105–114, 1997.
- ALVES, M. S. Obtenção e caracterização de biofilmes de gelatina. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2005. Piracicaba, Anais.Piracicaba: Universidade Metodista de Piracicaba. 2005. Disponível em <<http://www.unimep.br/phpg/mostracademica/anais/4mostra/pdfs/87.pdf>>. Acesso em 25 out. 2012.
- AMARAL, I. F.; UNGER, R. E.; FUCHS, S.; MENDONCA, A. M.; SOUSA, S.R.; BARBOSA, M.A.; PEGO, A.P.; KIRKPATRICK, C.J. Fibronectin-mediated endothelialisation of chitosan porous matrices. **Biomaterials**, v.30, p.5465-5475, 2009.
- ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 989-995, 2001.
- AOUADA, F.A.; MUNIZ, E.;VAZ, C.M.P.; MATTOSO, L.H.C., Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. **Quim.Nova**, v.32, p. 1482-1490, 2009.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v.26, p.56-62, 2007.
- ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 223-228, 2003.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 6023

AYALA, G.G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. **Molecule**, v.13, p. 2069-2106, 2008.

BATTISTI, M.V.; CAMPANA FILHO, S.P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Quim. Nova**, v. 31, p. 2014-2019, 2008.

BEPPU, M. M., ARRUDA, E. J., SANTANA, C. S. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.9, p163-169, 1999.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; VIEIRA, R.S.; SANTOS, N.N. Absorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. **J. Membr. Sci.**, v.240, p.227-235, 2004.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; Gurny, R.; Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.57, p.19-34, 2004

BIGI, A.; BORGHU, M.; FICHERA, A.M.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N. Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. **J. Therm. Anal Calorim.**, v.61, p.451-459, 2000.

BOGLE, G.; GARRETT, S.; STOLLER, N.H.; SWANBOM, D.D.; FULFS, J.C.; RODGERS, P.W.; WHITMAN, S.; (...); POLSON, A.M. Periodontal regeneration in naturally occurring class II furcation defects in beagle dogs after guided tissue regeneration with bioabsorbable barriers, **Journal of Periodontology**, v.68, p. 536-544, 1997.

BRISSON, D; VOHL, MC; ST-PIERRE, J; HUDSON, TJ; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process? **BioEssays** v.23, pp.534-542, 2001.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in reaction with chitin and chitosan characterization. **Polym.**, v.42, p.3569-3580, 2001.

CAMPOS JUNIOR, A. Fundamentos de uso de produtos regenerativos para periodontia e implantodontia, www.kunzel.com.br/kunzel/download/fundamentos.pdf, 2003.

CAMPOS, M. G. N.; GROSSO, C. R. F.; CÁDENAS, G.; MEI, L. H. I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposian**, v.229, p.253-257, 2005.

CHARULATHA, V.; RAJARAM, A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. **Biomaterials**, v. 24, p. 759-767, 2003.

COSTA JÚNIOR, E.S. Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial 2008. 133f. Dissertação. Curso De Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade de Minas Gerais, 2008.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan- a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 36, p.981-1014, 2011.

DEASY, P. B.; COLLINS, A. E. M.; MACCARTHY, D. J.; RUSSEL, R. J. Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for treatment of advanced periodontal disease. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 41, p. 694-699, 1989.

DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton**, v41, p.481-492, 2001.

DUTTA, P. K.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DUTTA, Chitin and chitosan for versatile applications. **JMS Polym. Rev.**, v.42, p. 307-354, 2002.

ERHART, E. A. Elementos de anatomia humana. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 272p, 1987.

FLEMMING, T.F. Periodontitis. **Ann Periodontol**, v 4, p.32-37, 1999.

GENCO, R.J. Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases. **J. Periodontol**, v.67, p.1041-1049, 1996.

GOIATO, M.C.; CASTELLEONI, L.; SANTOS, D.M.; GENNARI FILHO, H.; ASSUNÇÃO, W.G. Lesões orais provocadas pelo uso de próteses removíveis. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v.5, p.85-90, 2005.

GOISSIS, G. ; FIGUEIRÓ, S. D. ; BRAILE, D. M. ; ARAUJO, R. B.; RAMIREZ, V.D.A. Reticulação progressiva de pericárdio bovino com glutaraldeído para confecções de válvulas cardíacas biológicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 46-54, 1998.

GONSALES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C., Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quim. Nova**, v.34, p. 1215-1223, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.-L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **J. Food Sci.**, v.58, p.206-211, 1993.

GRANATO, A.E.C.; SOARES, C.P.; DEVITTO, A.H.; BUZONE, L.M.; VERCİK, L.C.O.; VERCİK, A.; RIGO, C.S. Avaliação da citotoxicidade de membranas de quitosana em cultura de células, 2009 Disponível em <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/RE_0541_0885_01.pdf> Acessado em 13 Jun 2013.

GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830p., 1989.

HARDWICK, R.; SCANTLEBURY, V.T.; SHANCHEZ, R.; WHITELY, N.; AMBRUSTER, J. Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. Guide bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence, p101-136, 1994

HE, Q.; AO, Q.; GONG, Y. Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 22, p. 2791-2802, 2011.

JAYAKRISHNAN; S.R. JAMEELA. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v.17, p.471-484, 1996.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.; KIMURA, I. Y. Liberação controlada de eosina impregnada em microesfera de copolímero de quitosana e poli (ácido acrílico). **Polímeros**, v.03, p.116-121, 2000.

KANK, H.J.; JO, C.; LEE, N. Y.; KWON, J.H.;BYON, M.W. A combination of gamma irradiation and CaCl₂ immersion for a pectin-based biodegradable film. **Carbohydrate Polymers**, v.60, p.547-551, 2005.

KARRING, T.; NYMAN, S.; LINDHE, J.; SIRIRAT, M. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. **Journal of Clinical Periodontology**, v.11, p. 41-52, 1984.

KATHURIA, N.; TRIPATHI, A.; KAR, K.K.; KUMAR; A; Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan–gelatin cryogels for tissue engineering. **Acta Biomaterials**, v.5, p. 406–418, 2009.

KAWAMURA, J.Y. Avaliação clínica, radiográfica e imunohistoquímica da doença periodontal em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002.

KAWANO, Y. Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. Coordenação Sebastião V. Canevarolo JR. São Paulo: Artliber Editora, 2003, p.17.

KERDVONGBUNDIT, V.; WIKESJO, U.M. Prevalence and severity of periodontal disease at mandibular molar teeth in smokers with regular oral hygiene habits. **J. Periodontol**, v.73, p.735-740, 2002.

KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials**, v.22, p.1705–1711, 2001.

KIKUCHI, M.; KOYAMA, Y.; YAMADA, T.; IMAMURA, Y.; OKADA, T.; SHIRAHAMA, N.;

AKITA, K.; TAKAKUDA, K.; TANAKA, J. Development of guided bone regeneration membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly (l-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) composites. **Biomaterials**, v.25, p.5979-5986, 2004.

KIM, S.; NIMNI, M. E.; YANG, Z.; HAN, B. Chitosan/gelatin- based films crosslinked by proanthocyanidin. **J. Biomed Mater Res Part B.**, v.75Bp. 442-450, 2005.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.**, v.46, p. 1-27, 2000.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LEE, Y.S. **J. Eletron. Microsc.**, v.43, p.131-140, 1994.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral 4a Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005.

LINDHE, J.; PONTORIERO, R.; BERGLUNDH, T.; ARAUJO, M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22 , p.276-283, 1995.

LIU, Y-L.; SU, Y-H.; LEE, K-R.; LAI, J-Y.; J. Crosslinked organic-inorganic hybrid chitosan membranes for pervaporation dehydration of isopropanol-water mixtures with a long-term stability. **J. Membr. Sci.**, v.251, p.233-238, 2005

LÖE, H.; ANERUD, A.; BOYSEN, H.; MORRISON, E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **Journal of Clinical Periodontology**, v.13, p. 431-445, 1986

LÓPES, FD; REVILLA, JLG; MUNILLA, MH. Glicerol. In: Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melão, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, cap. 5.4, p. 393-397, 1999.

MACEDO, N. L.; MACEDO, L. G. S.; MATUDA, F. S.; MONTEIRO, A. S. F.; CARVALHO, Y. R. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. **Brazilian Dental Journal**, v.14, p.119-24, 2003.

MACEDO, N. L.; MATUDA, F. S.; DE MACEDO, L. G. S.; MONTEIRO, A. S. F.; VALERA, M. C.; CARVALHO, Y. R. Evaluation of two membranes in guided bone tissue regeneration: histological study in rabbits. **Brazilian Journal of Oral Science.**, v.3, p. 395-400, 2004.

MARQUES, A.H.; SOLIS, A.C.O.; LOTUFO NETO, F.; ; LOTUFO, R.F.M.; PRADO, E.B.A. Estresse, dea vácuo, alterações imunológicas e doença periodontal **Rev. Psiq. Clín.**, v.28, p.266-273, 2001

MARTUCCI, J.F.; RUSECKAITE, R.A.; VAZQUEZ, A. Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. **Materials Science and Engineering**, v.435, p.681-686, 2006.

MATHUR, N.K.; NARANG, Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **C.K. J. Chem. Educ.**, v. 67, p. 938, 1990.

MEI, L.H.I.; LEITE, R.C.; FELISBERTI, M.I. Hidrogéis de poli(álcool vinílico): caracterização do grau de intumescimento e de reticulação para aplicação em liberação controlada de drogas, *III Congresso Brasileiro de Polimeros*, p.269-272, 1995.

MELCHER, A.H. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. **Arch Oral Biol.**, v.15, p. 1183-204, 1970.

MONBELLI, A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. **Oral Dis.**, v.9, p. 6-10, 2003.

MONTEIRO JÚNIOR., O.A.C.; AIROLDI, C.; Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.26, p. 119-128, 1999.

MONTEIRO JÚNIOR, O. A. C., Preparação química e calorimétrica do biopolímero Quitosana. 1999. 128f. Tese. Doutorado em química, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MUYONGA, J.H.; COLE, C.G. B.; DUODU, K.G. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 81-89, 2004.
MUZZARELLI RA, MATTIOLI-BELMONTE M, TIETZ C, BIAGINI R, FEROLI G, BRUNELLI MA, et al Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**, v.15, p.1075-1081, 1994.

NETO, C. G. T. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, v.340, p.2630-2636, 2005.

NEVOIGT, E; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p. 231-241, 1997.

NIMNI, M. E. Glutaraldehyde fixation revisited. **J. Long-Term. Eff. Med. Implants**, v.11, p. 151-161, 2001.

OFOKANSI, K.; WINTER, G. FRICKER, G.; COESTER, C. Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.76, p. 1-9, 2010.

OLIVEIRA, T.A.; LEITE, R.H.L.; AROUCHA, E.M.M.; NOBRE, D.M.; SANTOS, F.K.G. Biofilmes

de gelatina: Efeito da adição de surfactante e ácidos graxos de óleo de coco na permeabilidade ao vapor de água. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, p. 76-80, 2012.

OLYMPIO, K.P.K.; BARDAL, P.A.P.; HENRIQUES, J.F.C.; BASTOS, J.R.M. Prevenção de cárie dentária e doença periodontal em Ortodontia: uma necessidade imprescindível. **R. Dental Press. Ortodon. Ortop. Facial**, v.11, p. 110-119, 2006.

OSHITA, K.; GAO, Y. H.; OSHIMA, M.; MOTOMIZU, S. **Anal. Chim. Acta**, v. 480, p. 239, 2003.

PARK, E.; CONDRATE, R.A. Graded coating of hydroxyapatite and titanium by atmospheric plasma spraying. **Material Letters**, v.40, p.228-234, 1990.

PARK, J.S.; CHOI, S.H.; MOON, I.S.; CHO, K.S.; CHAI, J.K.; KIM, C.K. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. **J Clin Periodontol.**, v.30, p.443-453, 2003.

PASSINI JÚNIOR, R.; NOMURA, M.L.; POLITA, G.T. Doença periodontal e complicações obstétricas: há relação de risco? **Rev Bras Ginecol Obste.**, v.29,p.372-377, 2007.

PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.27-46, 2000

PIAI, J. F. Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de quitosana/sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada. 2008. 61f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2008.

PIATTELLI, A.; FRANCO, M.; FERRONATO, G.; SANTELLO, M.T.; MARTINETTI, R.; SCARANO, A. Resorption of composite polymer-hydroxyapatite membranes: a time-course study in rabbit. **Biomaterials**, v.18, p.629-633, 1997.

RABEA, E.I. et al Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromol.**, v.4, p.1457-1465, 2003.

RATNER, B. D. Characterization of biomaterial surfaces. **Cardiovasc. Pathol.**, v.2, p.87s-100s, 1993.

REHM, H. Microbial production of glycerol and other polyols. **Biotechnology**, v.6B, p.52-64, 1988.

REP, M; ALBERTYN, J; THEVELEIN, JM; PRIOR, BA; HOHMANN, S. Different signaling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.145, p. 715-727, 1999.

RIGO, E.C.S.; ALMEIDA, K.; BUZONE, L.M.; DOMINATO, J.C.; VERCIK, L.C.O.; VERCIK, A. Membrana de gelatina/quitosana com e sem recobrimento de hidroxiapatita. In: **6th Latin American**

Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010, Gramado, **Anais...**Gramado: UFRGS/FAURGS, 2010.

ROCASALBASA, G.; FRANCESKOA, A.; TOURINO, X.F.F.; GUEBITZC, G.M. TZANOVA, T. Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p.989-996, 2013.

ROKHADE, A. P. et al. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymer**, v.67, p.605-613, 2007.

SALLUM, A.W.; CÉSAR NETO, J.B.; SALLUM, E.J. Tabagismo e a doença periodontal **Periodontia**, v.12, p.46-54, 2007

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosan. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.37-51, 1999.

SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H. SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.18, p.237, 1996

SILVA, G. L. Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos: *Salmonella entérica*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* EPEC. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SILVA, R.M.; SILVA, G.A.; COUTINHO, O.P.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. **Journal of materials science: materials in medicine**, v.15, p.1105-1112, 2004.

SIMMONS, D.M.; KEARNEY, J.N.; Evaluation of collagen cross-linking techniques for the stabilization of tissue matrices. **Biotechnol Appl Biochem**, v.17, p.23-29, 1993.

SINGH, S.; RAMA RAO, K.V.; VENUGOPAL, K.; MANIKANDAN, R. Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations. **Pharmaceutical Technology**, v.4, p.36-58, 2002.

SINGLA AK, CHAWLA M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. **J Pharm. Pharmacol.**, v.53, p.1047-1067, 2001

SRIAMORNSAK, P.; THIRAWONG, N. YOSSANUN, W.; NUNTHANIND, J. SUNGTHONGJEEN, S. Swelling and erosion of pectin matrix tablets and their impact on drug release behavior. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.67, p. 211-219, 2007.

STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M. Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental diseases. In: TYLE, P. (ed.). *Drug Delivery Devices*. New York: Marcel Dekker, p. 491-515, 1988.

TAN, H.; GONG, Y.; LAO, L.; MAO, Z.; GAO, C., Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering. **Mater. Med.**, v 18, p.1961–1968, 2007.

TATSCH, P.J. Deposição de filmes finos. **V Oficina de Microeletrônica**, Campinas, p. 1-8, 1998. Disponível em < <http://www.ccs.unicamp.br/cursos/fee107/download/cap11.pdf> >. Acesso em 25 de Jun. 2013.

THEIN-HAN, W.W.; KITIYANANT, Y. Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.80, p.92-101, 2007.

TSAI, G. J.; SU, W. H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **J. Food. Prot.**, v.62, p.239-243, 1999.

VIJAYARAGHAVAN, R.; THOMPSON, B.C.; MACFARLANE, D.R.; KUMAR, R.; SURIANARAYANAN, M.; AISHWARYAB, S.; SE, P.K. Biocompatibility of choline salts as crosslinking agents for collagen based biomaterials. **Chem. Commun.**, v.46, p.294-296, 2006.

WANG, H. L.; MACNEIL, R. L. Guided tissue regeneration. Absorbable barrier. **Dent. Clin. North. Am.**, v.42, p. 505,522, 1998.

WANG, T, et al Selected properties of pH-sensitive, biodegradable quitosana-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v.53, p.911-918, 2004.

WANG, ZX; ZHUGE, J; FANG, H; PRIOR, BA. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances** ,v.19, p. 201-223, 2001.

WEHBA, C, RODRIGUES, A.S, SOARES, F.P. Diabetes e doença periodontal: uma relação bidirecional In: Brunette CM. *Periodontia Médica: Uma abordagem integrada*. São Paulo: Senac, p. 172-195, 2004.

WOLF, K. L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra de pós de colágeno. 2007. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, 2007.

YANG, C.; XU, L.; ZHOU, Y; ZHANG, X.; HUANG, X.; WANG, M.; HAN, Y.; ZHAI, M.; WEI, S.; LI, J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing, **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.1297–1305, 2010.

YOSHIOKA, S.A.; BRAILE, D.M.; RAMIREZ, V.; GOISSIS, G. Reticulação de matrizes colagênicas com diacetais de glutaraldeído para a preparação de novos biomateriais. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.47, 1995.

YUAN, L.C.; XIN, H.; AI, D.Q. Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with gelatin and its effects on articular chondrocytes *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.**, v.66, p.770-778, 2003.

ZHANG YF, CHENG XR, CHEN Y, SHI B, CHEN XH, XU DX, ET AL Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. **J Biomater Appl.**, v. 21, p.333-349, 2007.

ZHANG, Y. et al Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. **Colloid. Polym. Sci.**, v.285, p.855-863, 2007.

ZHENG, Z.; ZHANG, L.; KONG, L.; WANG, A.; GONG, Y.; ZHANG, X. The behavior of MC3T3–E1 cells on chitosan/poly-L-lysine composite films: effect of nanotopography, surface chemistry, and wettability. **J Biomed Mater Res A.**, v. 89^a, p. 453-465, 2009.

ZHIYUAN PENG, ZHIPING LI, AND YONGQIANG SHEN. Influence of Chemical Cross-Linking on Properties of Gelatin/Chitosan Microspheres. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v.51, p.381-385, 2012

ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Caracterização químico-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 61-71, 2009.

ZINA, L. G.; MOIMAZ, S. A. S; SALIBA, N. A.; GARBIN, C. A. S. Periodontite materna e parto prematuro: aspectos biológicos, epidemiológicos e preventivos. **Periodontia**, v.15, p.10-15, 2005.